

ZALMIR SILVINO CUBAS

SIDEROSE HEPÁTICA EM TUCANOS E ARAÇARIS

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, pelo programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná – UFPR

Orientador: Fabiano Montiani-Ferreira

Curitiba, 2008

Cubas, Zalmir Silvino

Siderose hepática em tucanos e araçaris / Zalmir Silvino
Cubas – Curitiba, 2008.

158f.

Orientador: Fabiano Montiani Ferreira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de
Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

1. Tucanos. 2. Animais silvestres. 3. Siderose hepática. I. Título.

CDU 598.721:616.36

CDD 598.72

Termo de Aprovação

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

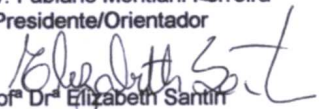


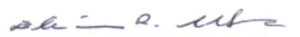
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“SIDEROSE HEPÁTICA EM TUCANOS E ARAÇARIS”** apresentada pelo Mestrando ZALMIR SILVINO CUBAS, declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03–CEPE/UFPR, que considerou o candidato APTO para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 28 de fevereiro de 2008.


Prof. Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Presidente/Orientador


Prof. Dr. Elizabeth Santin
Membro


Prof. Dr. Eliana Reiko Matushima
Membro

Ao meu pai Zulei (*in memoriam*) e à minha mãe Nair,
por terem investido na minha educação.

À minha esposa Patrícia,
que me apoiou e compreendeu todo o meu investimento no Mestrado.

Às minhas filhas Rafaela e Isabela,
por simplesmente existirem e serem luz na minha vida.

Aos meus familiares e amigos,
que se importam comigo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Fabiano Montiani-Ferreira, que me deu a oportunidade de pensar, agir e pesquisar com iniciativa. Agradeço por compreender minhas dificuldades logísticas e minha necessidade de compatibilizar o estudo com o trabalho e a família. Aprendi muito com você.

À professora Eliana Reiko Matushima, que me estendeu a mão como amiga e mestre de verdade. Sem o seu envolvimento a tese não teria saído.

Ao sábio professor José Luiz Catão-Dias, que sempre tem o conselho certo para trazer luz ao caminho. Obrigado também por ceder o laboratório.

À professora Karin Werther, por ter aberto as portas para mim com entusiasmo e profissionalismo. O material de pesquisa cedido foi imprescindível.

Ao professor João Batista da Cruz, pelo espírito de companheirismo e firmeza nas decisões.

Ao professor Ricardo de Francisco Strefezzi, que facilitou as coisas para mim, mostrando como utilizar, passo a passo, um programa complexo de análise morfométrica de imagens.

Ao amigo de trabalho Wanderlei de Moraes, que me orientou nos trâmites burocráticos na empresa e me deu todo o apoio para que eu pudesse concluir o Mestrado.

Aos companheiros João Antonio Cordoni e Edson Zanlorensi, que me deram a oportunidade de continuar o Mestrado, justamente no momento em que eu ingressava na Itaipu Binacional.

Aos meus amigos de trabalho Marcos José de Oliveira, Rosana Pinto de Almeida, Leonilda Correa dos Santos e Renata Carolina Fernandes Santos, que me incentivaram e me ajudaram nos momentos de correria para finalizar a pesquisa e a dissertação.

Aos colegas do IAP (Instituto Ambiental do Paraná), em especial ao Jéferson Luiz Lira e Carlos Antônio Pittom, que compreenderam minha motivação para ingressar no Mestrado e não puseram nenhum obstáculo para que isso acontecesse.

Ao empresário e companheiro Darci Dércio Haack, que patrocinou parte do material utilizado na pesquisa do Mestrado.

Ao amigo Luiz Roberto Francisco, um parceiro de sonhos, e que muitas vezes, por eu estar em Foz do Iguaçu e ele em Curitiba, “quebrou um galho” resolvendo assuntos burocráticos relativos ao Mestrado.

A todo o pessoal da minha turma de Mestrado: pessoas decentes, lutadoras e motivadas em suas áreas de trabalho. Assistir aulas com vocês quase todas as semanas durante um ano foi uma experiência revigorante.

À minha mãe Nair de Souza Cubas, que me albergou em sua casa com comida e muito carinho todas as vezes que eu estive em Curitiba para assistir aulas e tratar de assuntos do Mestrado.

À minha irmã Miriam de Fátima Cubas Brand e irmão Zalmen Fauri Cubas, pelo incentivo; e em especial, à minha irmã Lílian Izabel Cubas, pelas inúmeras vezes que me levou à rodoviária após as aulas, e também pela ajuda bem-vinda na hora certa.

Ao meu Comitê de Orientação formado pela professora Elizabeth Santin e professor Antônio Felipe P.F. Wouk.

À minha banca de qualificação formada pela professora Rosangela Locatelli Dittrich e professor Ivan Roque de Barros Filho, além do meu orientador.

Ao professor Rogério Ribas Lange, por disponibilizar a estrutura do Hospital Veterinário para a pesquisa.

Ao professor José Ricardo Pachaly, por me incentivar e por ter dado boas referências de mim antes de eu ingressar no Mestrado.

À Maria José Botelho Maeda, que sempre me atendeu com respeito e consideração na Secretaria da Pós-Graduação.

A todos os que me ajudaram de forma direta ou indireta e que eu, porventura, tenha deixado de mencionar nesse agradecimento, muito obrigado!

A pessoa que é responsável pela vida de um animal deve também se preocupar com os sentimentos dele.

(Murray E. Fowler)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xix
1 HEMOSSIDEROSE E HEMOCROMATOSE EM AVES SILVESTRES.....	21
RESUMO	21
ABSTRACT.....	22
1.1 INTRODUÇÃO.....	23
1.2 HISTÓRICO.....	24
1.3 ETIOLOGIA	25
1.4 ESPÉCIES SUSCETÍVEIS	27
1.5 PATOGENIA.....	29
1.5.1 Aspectos nutricionais na siderose hepática	32
1.6 SINAIS CLÍNICOS	34
1.7 ALTERAÇÕES ANATOMO E HISTOPATOLÓGICAS.....	35
1.8 DIAGNÓSTICO.....	39
1.9 TERAPÊUTICA.....	42
1.10 PREVENÇÃO	46
1.11 REFERÊNCIAS	47
2 FISIOLOGIA DO FERRO E FISIOPATOLOGIA DA HEMOCROMATOSE	60
HEREDITÁRIA	60
RESUMO.....	60
ABSTRACT	61
2.1 INTRODUÇÃO.....	62
2.2 FISIOLOGIA DO FERRO.....	65
2.2.1 Citocromo-b duodenal ou Dcytb (<i>Duodenal Cytochrome b</i>)	70
2.2.2 Proteína transportadora de íon metal divalente-1 ou DMT-1 (<i>Divalent metal transporter</i>).....	70

2.2.3 Ferroportina/ proteína reguladora de ferro-1/ Ireg1 (<i>Iron Regulator 1</i>)....	71
2.2.4 Hefastina e ceruloplamina	71
2.2.5 Transferrina (Tf)	71
2.2.6 Receptor da transferrina-1 ou TfR1 (<i>Transferrin Receptor 1</i>).....	72
2.2.7 Receptor da transferrina-2 ou TfR2 (<i>Transferrin Receptor 2</i>).....	72
2.2.8 Proteína da hemocromatose/ HFE (<i>Human Hemochromatosis Protein</i>)..	72
2.2.9 Ferritina e hemossiderina.....	73
2.2.10 Hepcidina, acrônimo de <i>Hepatic Bactericidal Protein</i>	73
2.2.11 Hemojuvelina (HJV)	74
2.2.12 Proteínas reguladoras de ferro 1 e 2 ou IRP1 e IRP2 (<i>Iron Regulatory Protein 1, 2</i>).....	74
2.3 MODELOS FISIOLÓGICOS	75
2.3.1 Modelo programação das criptas	75
2.3.2 Modelo sistêmico	75
2.3.3 Modelo duas vias	76
2.4 FISIOPATOLOGIA DA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA	77
2.5 REFERÊNCIAS	78
3 ESTUDO RETROSPECTIVO DA SIDEROSE HEPÁTICA EM TUCANOS E	
ARAÇARIS (RAMPHASTIDAE, PICIFORMES, AVES).....	83
RESUMO.....	83
ABSTRACT	85
3.1 INTRODUÇÃO.....	86
3.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	87
3.2.1 Espécies suscetíveis	87
3.2.2 Hábitos alimentares dos ranfastídeos	87
3.2.3 Reprodução dos ranfastídeos em cativeiro	88
3.2.4 Termos médicos e definições no contexto da siderose hepática	88
3.2.5 Patogenia da sobrecarga de ferro	89
3.2.6 Alterações histológicas decorrentes da sobrecarga de ferro.....	91
3.2.7 Sinais clínicos	94
3.2.8 Diagnóstico	94
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	98
3.3.1 Origem do material biológico.....	98

3.3.2 Coleta e fixação do material biológico.....	99
3.3.3 Histórico do material biológico	99
3.3.4 Preparação histológica.....	99
3.3.5 Análise histopatológica.....	100
3.3.6 Análise histomorfométrica	110
3.3.8 Análise estatística	114
3.3.9 Redação e editoração	114
3.4 RESULTADOS	115
3.4.1 Relativos às amostras	115
3.4.2 Relativos aos métodos	119
3.4.3 Relativos ao manejo animal	120
3.4.4 Relativos à Patologia.....	122
3.4.5 Relativos à epidemiologia	131
3.5 DISCUSSÃO.....	132
3.5.1 Relativa às amostras.....	132
3.5.2 Relativa aos métodos.....	135
3.5.3 Relativa ao manejo animal	137
3.5.4 Relativa à Patologia	138
3.5.5 Relativa à Epidemiologia.....	140
3.6 CONCLUSÕES.....	141
3.7 REFERÊNCIAS	142
CONSIDERAÇÕES FINAIS	150
ANEXO 1 – Fotos de tucanos e aráçarís.....	152
ANEXO 2 – Aprovação do Comitê de Ética	156
ANEXO 3 - Documento de aprovação do IBAMA.....	157

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CORRELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA	116
TABELA 2 - CORRELAÇÃO ENTRE GÊNERO E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA	117
TABELA 3 - CORRELAÇÃO ENTRE ORIGEM DOS CASOS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA	118
TABELA 4 - CORRELAÇÃO ENTRE SISTEMA DE CRIAÇÃO E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA.....	120
TABELA 5 - CORRELAÇÃO ENTRE TEMPO DE CATIVEIRO E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA.....	122
TABELA 6 - CORRELAÇÃO ENTRE PROCESSOS DEGENERATIVOS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA.....	125
TABELA 7 - CORRELAÇÃO ENTRE NECROSE E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA	126
TABELA 8 - CORRELAÇÃO ENTRE PROCESSO INFLAMATÓRIO E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA.....	127
TABELA 9 - CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE ACUMULADO PARA LESÕES HEPÁTICAS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA	129
TABELA 10 - QUANTIDADE DE AGREGADOS MONONUCLEAR-FAGOCÍTICOS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA.....	130

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - TIPOS E CARACTERÍSTICAS DA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA (HH) NOS SERES HUMANOS.....	65
QUADRO 2 - SISTEMA DE GRADUAÇÃO PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADO COM COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA.....	108
QUADRO 3 - SISTEMA DE GRADUAÇÃO PARA ANÁLISE HISTOPALÓGICA DE FÍGADO COM COLORAÇÃO AZUL DA PRÚSSIA OU PERL'S.....	110
QUADRO 4 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS CONFORME O ANO DE COLETA.....	116
QUADRO 5 - DISTRIBUIÇÃO DE CASOS CONFORME ESCORES PARA SIDEROSE HEPÁTICA E RESPECTIVAS TAXAS DE SIDEROSE HEPÁTICA.....	119
QUADRO 6 - DISTRIBUIÇÃO DE CASOS POR SISTEMA DE CRIAÇÃO EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS DA ESPÉCIE TUCANO-TOCO E CASOS ORIGINÁRIOS DA UNESP	121
QUADRO 7 - DISTRIBUIÇÃO DE CASOS CONFORME A CAUSA MORTIS E SISTEMA ACOMETIDO.....	123
QUADRO 8 - DISTRIBUIÇÃO DE CASOS CONFORME GRAU DAS LESÕES HEPÁTICAS.....	124

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fotografia de cavidade celomática de tucano-toco (<i>Ramphastos toco</i>) que veio a óbito em decorrência de insuficiência hepática e hemocromatose.....	93
FIGURA 2 – Fotografia de necropsia de tucano-toco (<i>R. toco</i>) que veio a óbito por insuficiência hepática e hemocromatose.....	93
FIGURA 3 – Fotomicrografia ótica representativa de fígado de araçari-poca (<i>Selenidera maculirostris</i>) sem depósito de hemossiderina.	102
FIGURA 4 – Fotomicrografia ótica representativa de depósitos leves de hemossiderina no fígado de um araçari-castanho (<i>Pteroglossus castanotis</i>).	102
FIGURA 5 – Fotomicrografia ótica representativa de depósitos moderados de hemossiderina no fígado de um tucano-toco (<i>R. toco</i>).....	103
FIGURA 6 – Fotomicrografia ótica representativa de depósitos severos de hemossiderina no fígado de um tucano-toco (<i>R. toco</i>).....	103
FIGURA 7 – Fotomicrografia de fígado de araçari-banana (<i>Bailloniuss bailloni</i>).	106
FIGURA 8 – Fotomicrografia de fígado de tucano-de-bico-verde (<i>R. dicolorus</i>).	106
FIGURA 9 – Fotomicrografia de fígado de tucano-toco (<i>R. toco</i>) evidenciando espaço porta com seus componentes característicos	107
FIGURA 10 – Fotomicrografia de fígado de tucano-toco (<i>Ramphastos toco</i>) com depósitos de hemossiderina (corados em azul) e imagem convertida.	113
FIGURA 11 – CORRELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA	117
FIGURA 12 - CORRELAÇÃO ENTRE ORIGEM DOS CASOS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA.....	118
FIGURA 13 - CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE HISTOPATOLÓGICO PARA SIDEROSE HEPÁTICA E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA.....	119

FIGURA 14 - CORRELAÇÃO ENTRE SISTEMA DE CRIAÇÃO E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA.....	121
FIGURA 15 - CORRELAÇÃO ENTRE TEMPO DE CATIVEIRO E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA.....	122
FIGURA 16 - DISTRIBUIÇÃO DE CASOS CONFORME GRAU DAS LESÕES HEPÁTICAS.....	125
FIGURA 17 - CORRELAÇÃO ENTRE PROCESSOS DEGENERATIVOS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT	Alanina Aminotransferase
AP	Azul da Prússia
AST	Aspartato Aminotransferase
BMP	Proteína Óssea Morfogênica
BMS	Susceptometria Biomagnética
CK	Creatininacinase
DCT1	Proteína Transportadora de Cátion Divalente-1
Dcytb	Citocromo-B duodenal
DDF	Doença do Depósito de Ferro
DFO	Desferoxamina
DMT-1	Proteína Transportadora de Metal Divalente-1
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPX	Resina para montagem histológica
DSF	Doença da Sobrecarga de Ferro
EASL	Associação Européia de Estudo do Fígado
EOS	Espécies Ativas de Oxigênio
EV	Via endovenosa
Fe	Ferro
FA	Fosfatase alcalina
Fe ²⁺	Ferro divalente ou ferro na forma ferrosa
Fe ³⁺	Ferro trivalente ou ferro na forma férrica
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FPZSP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo
Ft	Ferritina
g	Grama
g/dL	Grama por decilitro
GDH	Glutamato Desidrogenase
GGT	Gama-glutiltransferase
HAMP	Gene Peptídeo Antimicrobiano Hecpidina
HC	Hemocromatose Hereditária

HE	Hematoxilina e Eosina
HFE	Proteína da Hemocromatose
HH	Hemocromatose Hereditária
HJV	Hemojuvelina
HLA	Gene Antígeno Leucocitário Humano
IRE	Elementos Ferro-responsivos
Ireg1	Proteína Reguladora do ferro-1
IRP	Proteína Ferro-responsivas
IST	Índice de Saturação da Transferrina
ITAIPU	Itaipu Binacional
LDH	Desidrogenase Láctica
LEAP	Peptídeo Antimicrobiano Expresso no Fígado
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/kg	Miligramas por quilograma
mL	Mililitro
mmol	Milimol
MRT	Ressonância Magnética
NRamp2	Proteína em Macrófago Associada à Resistência Natural-2
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
PUC	Pontifícia Universidade Católica
QID	Quatro vezes ao dia
RNA _m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
ROS	Espécies Ativas de Oxigênio
SC	Via subcutânea
SQUID	Magnetômetro Supercondutor
Tf	Transferrina
TfR	Receptor de Transferrina
TIBC	Capacidade Total de Ligação do Ferro
TID	Três vezes ao dia
TM	Tricrômio de Masson
TSH	Taxa de Siderose Hepática
UIBC	Capacidade de Ligação do Ferro Não Saturado

UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
UTR	Região Não-traduzida do RNAm
µg/dL	Micrograma por decilitro
µm	Micrômetro

RESUMO

SIDEROSE HEPÁTICA EM TUCANOS E ARAÇARIS

Siderose ou hemossiderose é a deposição de ferro em tecidos na forma de hemossiderina. O acúmulo de quantidades excessivas de hemossiderina, principalmente no fígado, causa a sobrecarga de ferro, que acompanhada de lesões celulares significativas pode comprometer a integridade histológica e a capacidade funcional destes mesmos órgãos, ocorrendo a doença denominada hemocromatose, Doença da Sobrecarga de Ferro ou Doença do Depósito de Ferro. Algumas espécies de aves silvestres, principalmente espécies frugívoras e insetívoras como tucanos e araçaris (Ramphastidae, Piciformes) são particularmente suscetíveis à hemocromatose quando mantidas em cativeiro com dietas ricas em ferro. É bem relatada na literatura a ocorrência de hemocromatose e a morte de aves silvestres, fator que põe em risco a conservação das populações *ex-situ* dos Ramphastidae. O presente estudo foi realizado com o objetivo de se conhecer a prevalência da sobrecarga de ferro e hemocromatose em populações de tucanos e araçaris mantidas em zoológicos e criatórios brasileiros e correlacioná-las com fatores potencialmente predisponentes. Até onde se sabe, esse é o primeiro estudo longitudinal retrospectivo já realizado nesse grupo de aves, que incluiu amostra variada e coletada num período de 17 anos em várias instituições no Brasil, portanto, trata-se de um estudo multicêntrico. O **capítulo 1** consiste de uma revisão bibliográfica da hemossiderose e hemocromatose em aves silvestres, tendo sido apresentados aspectos relativos à patologia e clínica médico-veterinária. Nos últimos anos, com o avanço das ciências biológicas, em particular da Genética e Biologia Molecular, o conhecimento do metabolismo do ferro sofreu alterações. No **capítulo 2**, uma revisão bibliográfica da fisiologia do ferro e aspectos gerais da fisiopatologia da Hemocromatose Hereditária, pretende-se informar sobre novos conceitos e teorias relativos à bioquímica, genética e fisiologia do ferro, aplicáveis não só ao ser humano, mas aos vertebrados de uma forma geral. O tema central da dissertação é apresentado no **capítulo 3**. Trata-se de um estudo retrospectivo da siderose hepática em uma amostra de 69 carcaças de tucanos e araçaris de oito espécies, utilizando-se como método de estudo a histopatologia e histomorfometria. As aves foram submetidas à necropsia no período de 1991 até 2007 em quatro instituições: Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional - PR, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Jaboticabal - SP, e o Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). O grau de siderose hepática foi correlacionado com as variáveis espécie, sexo, origem das aves, sistema de criação, tempo de cativeiro, *causa mortis* e lesões hepáticas. São apresentadas taxas de prevalência para a sobrecarga de ferro e hemocromatose na população estudada. É verificada a correlação entre as técnicas histopatológica e histomorfométrica. **Conclui-se** que a sobrecarga hepática e a hemocromatose apresentaram alta prevalência na população estudada, tendo sido apontadas como *causa mortis* de tucanos e araçaris

cativos. Esses processos mórbidos representam, portanto, um empecilho à manutenção e reprodução dessas aves em cativeiro.

Palavras-chave: hemossiderose, hemocromatose, sobrecarga de ferro, fígado, tucanos e araçaris.

ABSTRACT

HEPATIC SIDEROSIS IN TOUCANS, ARACARIS AND TOUCANETS

Siderosis or hemosiderosis means the deposition of iron in tissues in the form of hemosiderin. Accumulation of excessive hemosiderin, mainly in the liver, causes iron overload that if associated to significant cellular lesions may compromise tissue integrity and functional competence of affected organs, taking place the disease known as hemochromatosis, iron overload disease, or iron storage disease. Some avian species, mainly frugivorous and insectivorous birds such as toucans, aracarís and toucanets (Ramphastidae, Piciformes) are particularly susceptible to hemochromatosis when kept in captivity with high-iron diet. It is well documented in the literature death of exotic avian species due to hemochromatosis, which represents a risk factor to the conservation of *ex-situ* population of Ramphastidae. The objective of this investigation was to survey the occurrence of iron overload and hemochromatosis in captive populations of toucans and aracarís in Brazil and to correlate the disease with some predisposing factors. As far as it is known, this is the first retrospective longitudinal study in this family of birds, which included many species. This also is a multicentric study, since samples were obtained from many institutions and were collected along a 17 years period. In the **first chapter**, literature review about clinical and pathologic aspects of hemosiderosis and hemochromatosis in exotic avian species is presented. In the last years, with the advance of biological sciences, mainly Genetics and Molecular Biology, knowledge of the iron metabolism has changed considerably. The **second chapter** comprehends a literature review of iron physiology and an overview of the Hereditary Hemochromatosis pathophysiology. The objective is to inform about new concepts and theories related to biochemistry, genetics and physiology of iron not only in human beings, but in vertebrates in general. The central subject of the dissertation is presented in the **third chapter**, which is a retrospective study of hepatic siderosis in 69 carcasses of toucans and aracarís belonging to eight species, using histopathology and histomorphometric analyses. Birds were submitted to necropsies in the period of 1991 to 2007 in four institutions in Brazil: 1) Itaipu Binacional Wild Animal Breeding Center, Foz do Iguaçu – Paraná State; 2) Sao Paulo Zoological Park Foundation; 3) Laboratory of Veterinary Pathology of the Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal – São Paulo; and the 4) Comparative Pathology Laboratory of Wild Animals of the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). The degree of the hepatic siderosis was correlated to some variables as specie, sex, bird origin, management system, time spent in captivity, *causa mortis*, and hepatic lesions. Histopathology and histomorphometric methods were compared. The prevalence of iron overload and hemochromatosis in the population studied were calculated. In **conclusion**, iron overload and hemochromatosis were common in the population studied, being pointed out as the *causa mortis* of toucans and aracarís. Therefore, these morbid processes represent an obstacle to the maintenance and reproduction of toucans and aracarís in captivity in Brazil.

KEY-WORDS: hemochromatosis, hemosiderosis, iron storage disease, liver, toucans, araçaris and toucanets.

1 HEMOSSIDEROSE E HEMOCROMATOSE EM AVES SILVESTRES

RESUMO

O ferro é um microelemento essencial para todos os animais. Por apresentar efeitos tóxicos na forma livre ou quando em excesso, os organismos desenvolveram proteínas que fazem a absorção, transporte, utilização e depósito do ferro. Depósitos excessivos de ferro em órgãos parenquimatosos, principalmente no fígado, coração e baço, ocorrem nos seres humanos e em animais domésticos e selvagens. Aves silvestres frugívoras e insetívoras, como tucanos (Ramphastidae), mainás e estorninhos (Sturnidae), e aves-do-paraíso (Paradisaeidae) são particularmente predispostas à sobrecarga de ferro. Na hemossiderose, o acúmulo de ferro na forma de hemossiderina não causa significativo dano tecidual, enquanto que na hemocromatose há lesão necrótica multifocal com redução ou perda das funções dos órgãos envolvidos. A etiologia da sobrecarga de ferro em animais selvagens parece ser multifatorial. Em aves, os fatores determinantes da hemocromatose são genéticos e nutricionais. Os sinais clínicos são inespecíficos, estando normalmente relacionados com o acometimento do fígado, e incluem apatia, anorexia, perda de peso, ascite, dispnéia, hepatomegalia, cardiomegalia, debilidade progressiva, má aparência das penas e finalmente morte. O diagnóstico é feito pela anamnese, sinais clínicos, exames por imagem e patologia clínica, mas o teste padrão-ouro é a análise histológica de amostras hepáticas obtidas por biópsia ou necropsia. As alterações histopatológicas consistem em acúmulo de ferro em micelas de ferritina e agregados de hemossiderina, principalmente em hepatócitos e células do sistema reticuloendotelial. Na hemocromatose pode haver inflamação e em casos avançados níveis variados de necrose hepática e fibrose. O tratamento é feito por flebotomias frequentes e/ou quelantes como desferoxamina e deferiprona. A prevenção consiste em fornecer para espécies sensíveis dietas com baixos níveis de ferro e alimentos que não favoreçam a absorção intestinal de ferro.

PALAVRAS-CHAVE: hemossiderose, hemocromatose, ferro, fígado, animais selvagens, aves silvestres.

HEMOSIDEROSIS AND HEMOCHROMATOSIS IN NON DOMESTIC AVIAN SPECIES

ABSTRACT

All living beings require iron for physiological metabolic processes. As excess and free iron cause toxic effects in the organism, it needs to be controlled by specific proteins involved in iron absorption, transportation, utilization and storage in the cells. Excessive iron deposits in parenchymal organs, especially liver, heart and spleen occur in man and domestic and wild animals. Frugivorous and insectivorous bird species are particularly susceptible to iron overload disease, such as toucans (Ramphastidae), mynahs and starlings (Sturnidae), and birds-of-paradise (Paradisaeidae). In hemosiderosis iron stored in parenchyma as hemosiderin does not cause remarkable tissue damage, while in hemochromatosis multifocal necrotic lesion is seen with consequent decrease function or failure of the affected organ. Etiology of hemochromatosis in wild animals seems to be multifactorial. In wild birds hemochromatosis etiology is both genetic and nutritional. Clinical signs are unspecific, usually related to liver disease and include apathy, anorexy, weight loss, ascite, dyspnea, hepatomegaly, cardiomegaly, progressive weakness, poor feather condition, and ultimately death occurs. Diagnosis of iron overload is based on anamnesis, clinical signs, diagnostic imaging, and clinical pathology. The gold standard test is the histological analysis of liver fragments taken *ante mortem* by biopsy or at necropsy. Histologically, changes observed are iron storage as micelles of ferritin and granules of hemosiderin, mainly in hepatocits and reticuloendothelial cells. Inflammation may be seen in hemochromatosis, and in severe cases variable levels of liver necrosis and fibrosis occur. Therapy consists of periodic phlebotomies and or iron chelation with desferoxamine or deferiprone. Prevention of hepatic overload in susceptible species includes feeding low-iron diets and food items that reduce intestinal absorbance of bioavailable iron in the diet.

KEY WORDS: hemochromatosis, hemosiderosis, iron, liver, wild animals, wild birds.

1.1 INTRODUÇÃO

O depósito de ferro em órgãos parenquimatosos ocorre nos seres humanos e nos animais. Hemossiderose e hemocromatose são relatadas em animais domésticos e selvagens. Algumas espécies e famílias são mais predispostas à sobrecarga de ferro em razão de características genéticas evolutivas, manejo nutricional incorreto em cativeiro, doenças não infecciosas e infecciosas, e outros fatores que precisam ser elucidados (DIERENFELD et al., 1994; LOWESTINE e MUNSON, 1999; CORK, 2000)

O termo *hemossiderose* é usado quando o acúmulo progressivo de ferro em tecidos na forma de hemossiderina não causa alteração significativa na morfologia celular nem dano tecidual extenso que altere a função do órgão. *Hemocromatose* é a doença em que o acúmulo de hemossiderina em órgãos parenquimatosos, principalmente em fígado, causa dano à estrutura histológica e à função destes órgãos (LOWESTINE, 1986; LOWESTINE e MUNSON, 1999; RODENBUSCH et al., 2004, CARCIOFI e OLIVEIRA, 2007). Na hemossiderose, quando ocorre morte de hepatócitos, esta é do tipo necrose celular isolada sem desdobramento tecidual extenso ou significativo (CARCIOFI e OLIVEIRA, 2007). Os termos “Doença do Depósito de Ferro” (*iron storage disease*) ou DDF, e “Doença da Sobrecarga de Ferro” (*iron overload disease*) ou DSF são utilizados na literatura para diferenciar a doença que ocorre em animais, muitas vezes multifatorial, da hemocromatose humana, que é de origem genética (LOWESTINE e MUNSON, 1999; DREWS et al., 2004). Embora haja certa divergência quanto ao emprego destes termos, os vocábulos hemossiderose e hemocromatose são amplamente utilizados na literatura nacional e internacional para descrever alterações relacionadas ao acúmulo de ferro em órgãos parenquimatosos de animais (LOWESTINE e MUNSON, 1999; CORK, 2000; CARCIOFI e OLIVEIRA, 2007; CUBAS 2007). Nesta revisão serão utilizados os termos hemocromatose e DDF como sinônimos; e “depósito de ferro” como expressão mais abrangente, que pode compreender tanto a hemossiderose como a hemocromatose, sem especificá-las.

Em animais, a hemossiderose parece ser mais freqüente que a hemocromatose (LOWESTINE e MUNSON, 1999). Os órgãos mais afetados na

hemocromatose são o fígado, coração e baço, e os sinais clínicos estão normalmente relacionados à fibrose de fígado com decorrente colapso circulatório, ascite e hipoalbuminemia (METE et al., 2003). A hemocromatose está associada à doença hepática, podendo ocorrer hemorragias focais com congestões vasculares graves que se iniciam no sistema mononuclear-fagocitário e provocam lesão necrótica multifocal (CARCIOFI e OLIVEIRA, 2007). A doença é considerada um problema grave em aves e mamíferos selvagens de espécies suscetíveis, pois causa considerável mortalidade em populações cativas (RANDELL et al., 1981; CORK, 2000; WHITESIDE, 2001; CUBAS, 2001; CUBAS, 2007).

Estudos epidemiológicos da hemocromatose são necessários para se conhecer a extensão das perdas em cativeiro e para que se possa aperfeiçoar o manejo nutricional e o diagnóstico precoce da doença com técnicas seguras e eficazes.

1.2 HISTÓRICO

Em 1865, TROUSSEAU descreveu uma síndrome que causava cirrose portal, diabetes mellitus e pigmentação cutânea bronzina nos seres humanos. Porém, só em 1889 o termo hemocromatose foi utilizado pela primeira vez por VON RECKLINGHAUSEN (1889) para descrever uma doença decorrente do depósito de ferro em tecidos e que causava lesões em vários órgãos. Em 1935, SHELDON (1935) explicou a natureza hereditária da doença; em 1975, SIMON et al. (1975) relacionaram a hemocromatose humana com uma mutação no complexo HLA (Gene Antígeno Leucocitário Humano) do braço curto do cromossomo seis (SIMON et al., 1975; SIMON et al., 1976). Mas foi só em 1996 que FEDER e colaboradores finalmente identificaram o gene HFE (Proteína da Hemocromatose) da Hemocromatose Hereditária humana (FEDER et al., 1996).

No final da década de 1970 foi notado que em cadáveres de aves de espécies frugívoras, como aves-do-paraíso (Paradisaeidae), tucanos (Ramphastidae), e mainás (Sturnidae) havia alto acúmulo de ferro em fígado (LOWESTINE e PETRAK, 1980; FRANKENHUIS e ASSINK, 1981). Na década de 1980, à medida que investigações eram realizadas, os achados descritos em mainás e aves-do-paraíso

eram também relatados em aves de outras ordens (RANDELL et al., 1981; WADSWORTH et al., 1983; GRINER, 1983; WARD et al., 1988).

LOWESTINE (1986) publicou¹ que não havia sido diagnosticada hemossiderose em duas aves-do-paraíso retiradas da natureza e mantidas em cativeiro por um curto período de tempo, mas que essas mesmas aves, ao receberem ração de leitão com altos índices de ferro, apresentaram grandes depósitos de hemossiderina em órgãos parenquimatosos. TAYLOR (1984), após levantar a ocorrência de hemossiderose e hemocromatose em aves de várias espécies, concluiu que os depósitos de ferro em fígado eram maiores em indivíduos que estavam em cativeiro há mais tempo. Estes e outros achados levaram à conclusão de que a hemocromatose em animais deveria ser secundária à ingestão prolongada de alimentos com altos níveis de ferro, mas que deveria haver outros fatores predisponentes como anemia hemolítica, septicemia, intoxicação e emagrecimento (LOWESTINE, 1986; CORK, 2000). Publicações recentes informam que além da nutrição, devem ser levados em conta fatores genéticos peculiares a determinados *taxa* (SHEPPARD e DIERENFELD, 2002).

Com a evolução do conhecimento sobre a hemossiderose e hemocromatose em aves, a afecção passou a ser descrita em mamíferos, incluindo primatas, ungulados, felídeos, pinípedes, marsupiais e roedores (TAYLOR, 1984; LOWESTINE e MUNSON, 1999).

Estudos recentes buscam desvendar o mecanismo molecular envolvido na alta capacidade de absorção do ferro no intestino das aves e estabelecer protocolos seguros e eficazes para o diagnóstico e tratamento da doença em espécies sensíveis (METE et al., 2003; DREWS et al., 2004; METE et al., 2005; OLSEN et al., 2006).

1.3 ETIOLOGIA

A sobrecarga de ferro em animais pode ser classificada em genética, iatrogênica, por anemia hemolítica crônica, nutricional e experimental (SMITH, 1997).

¹ A partir de comunicação pessoal de FRANKENHUIS (1983)

Outra classificação possível para a sobrecarga de ferro é primária ou hereditária e secundária ou adquirida (fator nutricional, infeccioso, tóxico, por anemia ou secundária a outras doenças) [TRINDER et al., 2002]. As causas da hemocromatose primária nos seres humanos são mutações genéticas que aumentam a absorção de ferro no trato digestório, elevam a saturação da transferrina plasmática e favorecem a deposição anormal de hemossiderina nas células parenquimatosas (SMITH, 1997).

Em animais domésticos é descrita sobrecarga de ferro hereditária na raça bovina *Salers*. Os animais dessa raça, acometidos pela doença, apresentam elevação do ferro sérico e da saturação da transferrina e reduzida capacidade de ligação de ferro não saturado ou UIBC (HOUSE et al., 1994; SMITH, 1997).

Diferentemente da hemocromatose hereditária nos seres humanos, que ocorre em indivíduos com mutações genéticas que favorecem o surgimento da doença, em animais selvagens a característica genética afeta toda a espécie e não apenas determinados indivíduos (SHEPPARD e DIERENFELD, 2002).

Em aves silvestres não há consenso quanto à etiologia da hemocromatose (CORNELISSEN e RITCHIE, 1994; WORELL, 1997; CARCIOFI e OLIVEIRA, 2007). Especula-se que a falta de controle na absorção intestinal do ferro, o excesso do microelemento na dieta e a predisposição genética sejam os fatores etiológicos mais prováveis (CARCIOFI e OLIVEIRA, 2007). Estudos demonstraram que aves-do-paraíso absorvem 90% do ferro consumido, enquanto que nos seres humanos a absorção gastrintestinal é em média 10% do ferro ingerido (FRANKENHUIS et al., 1989). Em um estudo comparativo *in vitro* com isolamento de enterócitos de mainás (*Gracula religiosa*) e de galinha foi demonstrado que espécies sensíveis, como o mainá, apresentam alta eficiência na absorção de ferro e elevada retenção de ferro no organismo, e que não há redução da taxa de absorção mesmo quando está estabelecida uma sobrecarga de ferro (SCHMIDT et al., 2003; METE et al., 2003).

Sabe-se que aves silvestres de espécies suscetíveis à siderose hepática mantidas em cativeiro com alimentos ricos em ferro (por exemplo, ração de cães e gatos) apresentam deposição excessiva do mineral em órgãos parenquimatosos, podendo agravar a condição até ocorrer hemocromatose (WORELL, 1997; CRYSEI et al., 2000; CUBAS, 2001; CUBAS 2007; ANDREWS et al., 2005). Em um estudo experimental delineado com 56 filhotes de estorninho europeu (*Sturnus vulgaris*)

foram formados dois grupos. Um grupo recebeu dieta com níveis elevadíssimos de ferro (3.035ppm na matéria seca) e o outro recebeu dieta com 168ppm de ferro na matéria seca. Após oito semanas de experimento não houve diferença significativa na concentração de ferro hepático entre os dois grupos, mas na 16ª semana o grupo mantido com dieta de elevado teor de ferro apresentou diferença significativa na quantidade de ferro hepático, demonstrando que nesta espécie (e possivelmente em outras espécies propensas) o nível de ferro e o prazo de consumo da dieta determinam a ocorrência da sobrecarga hepática por ferro (CRISSEY et al., 2000).

Outras causas prováveis para a siderose em aves incluem estresse, parasitismo intestinal, doenças e a ingestão contínua de dietas com deficiência ou desequilíbrio de aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais (ALLEN e MONTALI, 1995; WORELL, 1997; CARCIOFI e OLIVEIRA, 2007).

Portanto, considera-se que a etiologia da siderose em aves silvestres seja multifatorial, sendo predominantes os fatores genético e nutricional.

1.4 ESPÉCIES SUSCETÍVEIS

A sobrecarga de ferro com doença clínica grave é descrita em mainás (RANDEL et al., 1981; GOSSELIN e KRAMER, 1983; METE et al., 2003), estorninhos (CRISSEY et al., 2000; OLSEN et al., 2006), tucanos (WORELL, 1993; CORNELISSEN e RITCHIE, 1994; CUBAS, 2001; CUBAS, 2007), aves-do-paraíso (FRANKENHUIS et al., 1989; SHEPPARD e DIERENFELD, 2002), calaus e quetzals (LOWESTINE, 1986), saíras e sanhaços (KINCAID e STOSKOPF, 1987), e lóris (WEST et al., 2001).

Ordens, famílias e subfamílias de aves sensíveis à hemocromatose ou hemossiderose multissistêmica incluem (conforme classificação de SIBLEY, 1996): Passeriformes: Sturnidae (mainás e estorninhos); Paradisaeinae (aves-do-paraíso); Tyrannidae, Contiginae (cotingas e anambés); Piprinae (tangerás dançarinos e uirapurus); Ptilonorhynchidae (espécies australianas); Thraupini (gaturamos, tiés, sanhaços); Corvinae (corvos e gralhas); Laniidae (*shrikes*); Coraciiformes: Cerilidae (martins-pescadores); Coraciidae (*rollers*); Bucerotiiformes (calaus); Columbiformes: Columbidae (pombas e rolinhas); Piciformes: Ramphastinae (tucanos e araçaris); Anseriformes: Anatidae (marrecos); Ciconiiformes: Phoenicopteridae (flamingos);

Musophagiformes: Musophagidae (turacos) [LOWESTINE e MUNSON, 1999], Craciformes: Cracidae (mutuns) [TURNER, 1994], e Psittacidae (WEST et al., 2001).

Em um estudo retrospectivo das causas de morte de 531 aves de 18 ordens na Sociedade de Zoológico de Londres, no período de 1976 a 1982, as espécies mais acometidas foram flamingos (Ciconiiformes), turacos (Musophagiformes), calaus (Bucerotiformes) e estorninhos (Passeriformes – Sturnidae) [WADSWORTH et al., 1983].

A hemocromatose é uma das doenças mais comuns em tucanos e araçarís (família Ramphastidae), tendo sido relatada em pelo menos 13 espécies (WORELL, 1997). Aparentemente não há espécies mais suscetíveis nesta família. O maior número de relatos de hemocromatose é em tucano-toco (*Ramphastos toco*), provavelmente pelo fato de ser a espécie mais comum em cativeiro (CUBAS, 2001). A hemocromatose foi diagnosticada em lóris de três espécies (Psittacidae) mantidos com dieta com níveis elevados de ferro (WEST et al., 2001).

Em mamíferos, hemossiderose e hemocromatose são descritas em lêmures (SPELMAN et al., 1989; ANDREWS et al., 2005; GLENN et al., 2006), siamang (*Hylobates syndactylus*) [MUNSON et al., 1991] e gorilas (*Gorilla* sp.) [LOWESTINE e MUNSON, 1999]; rinocerontes negros (*Diceros bicornis*) [KOCK et al., 1992; MONTALI e CITINO, 1993; SMITH et al., 1995], rinoceronte-de-sumatra (*Didemocrus sumatrensis*) [LOWESTINE e MUNSON, 1999] e antas (*Tapirus terrestris*, *T. indicus* e *T. bairdii*) [BONAR et al., 2006]. Em artiodáctilos, a hemossiderose hepática foi descrita em gazelas (*Gazella tompsoni* e *G. sommerringi*), markhor (*Capra flocconeri*), cabra-do-cáucaso (*Capra ibex caucásica*), muflon (*Ovis musimon*), cabra núbia (*Capra ibex*), cervo (*Cervus eldi*), cervo sika (*Cervus nippon*), muntjac (*Muntiacus* spp.), dik-dik (*Madoqua* spp.) e duikers (*Cephalophus dorsalis dorsalis*), bongos (*Boocercus eurycero*) [LOWESTINE e MUNSON, 1999], e renas (*Rangifer tarandus*) [BORCH-IOHNSSEN e NILSSEN, 1987]. Em carnívoros, a hemossiderose hepática foi descrita em guepardos (*Acyonix jubatus*) [LOWESTINE e MUNSON, 1999], leopardo-da-neve (*Uncia uncia*) [MUNSON e WORLEY, 1991], quati (*Nasua* spp.), e panda-vermelho (*Ailurus fulgens*) [LOWESTINE e MUNSON, 1999]. Em mamíferos marinhos, a hemossiderose neonatal hepatocelular é comum em focas (*Phoca vitulina*), elefante-marinho-do-norte (*Mlrounga angustirostris*) e baleias-cinzentas (*Eschrichtius robustus*

[LOWESTINE e MUNSON, 1999]. Outros grupos incluem os cangurus, Marsupialia (LOWESTINE e MUNSON, 1999), lebres-assobiadoras-afegãs (*Ochotona rufescens*), Lagomorpha (MADARAME et al., 1990), hiraxes, Hyracoidea (REGH et al., 1990), morcego-de-fruta-do-egito (*Rousettus aegyptiacus*), Chiroptera (CRAWSHAW et al., 1995; FARINA et al., 2005); esquilos-da-mongólia (*Meriones unguiculatus*), porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) e ratos - Rodentia (WAGNER e MANNING, 1976; CARTHEW et al., 1991).

1.5 PATOGENIA

De uma forma geral, a hemossiderose em animais resulta de: 1) Taxa de destruição de hemácias maior que a normal; 2) Redução da utilização de ferro existente no organismo para a produção de hemoglobina; 3) Aumento das reservas de ferro por ingestão ou causa iatrogênica (SCHMIDT et al., 2003; RODENBUSCH, 2004).

Em algumas espécies de aves, principalmente as migratórias, ocorrem mudanças sazonais fisiológicas na concentração de ferro nos tecidos, como parte do processo de muda de penas e período de reprodução (OSBORN, 1979; OSBORN e YOUNG, 1985; CORK, 2000). Em um estudo, aves que morreram no período pós-acasalamento apresentaram significativo aumento de pigmentos de ferro no fígado, indicando aumento da atividade hematopoiética na época reprodutiva relacionado a mudanças dos níveis de tiroxina (CORK et al., 1995). Foi observada variação sazonal na concentração de ferro hepático em estorninhos (*S. vulgaris*) migradores, ocorrendo maior deposição de hemossiderina no fígado no fim do período da muda, antes da migração, no outono e inverno. A concentração mais baixa de ferro hepático ocorreu após o período reprodutivo, na primavera e verão (OSBORN, 1979; GARCIA et al., 1984). Siderose sazonal foi também relatada em fêmeas de marreco (*Somateria molissima*) que não se alimentavam durante a fase de postura e choco (BORCH-IOHNSSEN et al., 1991). A patogênese sugerida para este depósito de ferro em órgãos parenquimatosos inclui aumento da absorção de ferro antes da formação do ovo, perda de parênquima hepático durante o período de jejum com aumento relativo na concentração de ferro, e aumento do catabolismo de tecidos e eritrócitos em decorrência de jejum durante o período reprodutivo (LOWESTINE e MUNSON,

1999; CORK et al., 1995). O aumento no depósito de ferro hepático pode ser uma forma de conservar o microelemento para posterior utilização pelos músculos após o período de jejum. A absorção de ferro também aumenta em decorrência do jejum na fase reprodutiva (LOWESTINE e MUNSON, 1999).

Toxinas e infecções que causam lesões no fígado podem levar a um depósito exagerado de ferro no órgão. Portanto, deve-se ter cuidado na interpretação da causa e efeito (LOWESTINE e MUNSON, 1999). Em um levantamento para determinar as causas de mortalidade de cisnes-de-pescoço-preto (*Cygnus melanocoryphus*) livres em um santuário natural na Província de Valdivia, Chile, foram realizados estudos histopatológicos em tecidos de 31 aves (11 mortas e 20 vivas), tendo sido encontrado em fígado hemossiderina em todas as amostras, acúmulo de macrófagos com hemossiderina em 58% das amostras coradas com Azul da Prússia, infiltrado inflamatório em 64,5% e anisocitose em 83,9% das amostras. As aves estavam magras e com alto grau de parasitismo. A causa da siderose hepática não foi determinada, mas concluiu-se que as mortes foram decorrentes de contaminação ambiental (JARAMILLO et al., 2004).

O saturnismo em aves aquáticas pode estar associado à hemossiderose hepática. Essa relação com níveis elevados de chumbo foi também demonstrado experimentalmente em calopsitas (McDONALD e LOWESTINE, 1983). Aves marinhas da espécie (*Ptychoramphus aleuticus*) e airos (*Uria aalge*) expostas experimentalmente ou acidentalmente a óleo combustível apresentaram acúmulo de hemossiderina em hepatócitos e em células de Kupffer. O estresse de captura por sete dias também provocou aumento de hemossiderina em aves controle, embora não na mesma intensidade que nas aves contaminadas com óleo (FRYE e LOWESTINE, 1985). Acredita-se que o estresse e aumento nos níveis de corticosteróides, destruição de eritrócitos e hepatotoxicidade estejam envolvidos na fisiopatologia da hemossiderose hepática tanto na intoxicação por chumbo quanto por óleo (LOWESTINE e MUNSON, 1999).

Doenças hemolíticas também podem causar hemossiderose em aves, sendo fatores etiológicos a intoxicação por metais pesados e infecção por hemoparasitas (por exemplo, *Plasmodium*). A redução na síntese de hemácias também pode causar hemossiderose nas aves. Pacientes que estão com balanço calórico negativo ou apresentam doenças crônicas param de produzir hemácias ou as produzem em

pequena quantidade, aumentando o reservatório de ferro nos tecidos. Como a destruição dos eritrócitos ocorre em um ritmo constante, o ferro reciclado dessas células acaba acumulando-se no fígado, baço, rim e fagócitos. Este é um processo reversível e não está relacionado a processo mórbido (SCHMIDT et al., 2003).

A hemocromatose ocorre em aves de espécies suscetíveis que apresentam alta eficiência na absorção de ferro no trato digestório e que não apresentam mecanismo de redução da absorção quando passam a receber dietas ricas em ferro. Acredita-se que as aves suscetíveis consomem, em seu habitat, alimentos que contêm pouco ferro ou ferro de baixa biodisponibilidade (SCHMIDT et al., 2003). Normalmente o ferro deposita-se no fígado por longos períodos até que surjam sinais clínicos da doença. Portanto, a presença de depósitos de hemossiderina em hepatócitos não é suficiente para o diagnóstico de hemocromatose (SCHMIDT et al., 2003).

Pombos e rolinhas que receberam ferro na alimentação na dose diária de 100mg/kg também apresentaram siderose hepática (DORRESTEIN et al., 1992). Em um experimento, estorninhos (*S. vulgaris*) foram alimentados com dieta com 3235ppm de ferro durante 31 dias para comparar quatro protocolos de tratamento, tendo sido possível induzir sobrecarga de ferro no fígado, comprovando a etiologia nutricional da hemossiderose hepática (GEOFFREY et al., 2006).

A sobrecarga de ferro também pode ser iatrogênica, induzida por via oral e parenteral. A administração de ferro dextran em galinhas resultou em aumento do hemossiderina em células de Kupffer após 24h e em hepatócitos após 48h. Após seis a dez dias, o ferro foi redistribuído principalmente para os hepatócitos, restando poucos depósitos no baço, medula óssea e intestino (LOWESTINE e MUNSON, 1999).

Sugere-se que a hemocromatose predisponha os animais a doenças infecto-parasitárias e neoplásicas. Em um estudo foi demonstrado que 75% das aves que apresentavam siderose hepática severa também apresentaram infecção microbiana ou parasitária (CORK et al., 1995). É relatada a ocorrência de hemossiderose hepática e bacteremia por *Klebsiella* em araçari-miudinho (*Pteroglossus viridis*) [WILSON, 1994], o que indica que hepatopatias decorrentes da DDF possam predispor aves da família Ramphastidae a infecções bacterianas e parasitárias, como capilariose, doença que causa alta mortalidade em tucanos nos zoológicos

brasileiros (CUBAS, 2001; CUBAS 2007). COSTA e CATÃO-DIAS (2000) realizaram um estudo retrospectivo de histomorfometria para avaliar a hemossiderose em 25 aves silvestres submetidas à necropsia e não encontraram diferença significativa entre o grupo de aves que morreram em decorrência de doenças infecciosas e parasitárias e o grupo de aves que morreram de outras causas. Porém, os autores alertaram que a amostra apresentava pouca homogeneidade quanto à origem, sexo, idade, proximidade taxonômica, condições de manejo e nutrição.

A hipoferremia e a diminuição da disponibilidade de ferro circulante são ocorrências aparentemente benéficas no controle das infecções, anemia decorrente de doenças crônicas e câncer. Isso pode ser explicado com três argumentos: 1) A retirada de ferro circulante e o seu depósito em células do sistema mononuclear-fagocítico reduzem a disponibilidade do mineral para microorganismos e células tumorais, sendo o ferro um elemento essencial para o crescimento e proliferação dos agentes invasivos; 2) A anemia decorrente da hipoferremia reduz a capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, sendo os tecidos proliferativos os mais afetados em razão da alta demanda energética para proliferação e diferenciação; 3) A redução do ferro metabolicamente ativo aumenta a resposta imune contra agentes invasores e células tumorais por estimular a via efetora imunomediada dos macrófagos e a diferenciação dos linfócitos (THEURL et al., 2005). Quando o estoque de ferro está aumentado no organismo, como ocorre na hemossiderose e hemocromatose, a saturação da transferrina sérica aumenta e há maior disponibilidade de ferro para os microorganismos invasores, favorecendo o crescimento e invasão de patógenos (WEINBERG et al., 1995).

1.5.1 Aspectos nutricionais na siderose hepática

A sobrecarga de ferro ocorre com mais frequência em aves de espécies que têm como dieta natural frutas e insetos. Supõe-se que as espécies suscetíveis desenvolveram mecanismos fisiológicos para uma eficiente absorção de ferro a partir de dietas naturais com baixa disponibilidade do elemento (METE et al., 2005). Estes mesmos mecanismos moleculares de eficiência na absorção em dietas naturais provocam a sobrecarga de ferro em aves cativas que consomem dieta com

níveis elevados de ferro (DIERENFELD et al., 1994; SHEPPARD e DIERENFELD, 2002).

Existem interações entre nutrientes bem estudadas na nutrição de aves de produção, as quais ocorrem pela carência ou excesso de vitaminas, minerais, fibras, gorduras e taninos na dieta (CORK, 2000; McDONALD, 2003). A interação entre nutrientes ocorre naturalmente no aparelho digestório das aves em vida livre, podendo comprometer a taxa de absorção de microelementos e minerais. Por exemplo, o tanino presente em folhas e cascas de frutas atua como quelante do ferro, reduzindo sua absorção. Oxalatos e fitatos em algumas plantas e altas quantidades de certos microelementos em bagas e certas frutas têm também a mesma ação quelante (CORK, 2000). Chás ricos em taninos podem ser usados na dieta de tucanos como quelantes naturais do ferro, porém têm como inconveniente a propriedade de poderem reduzir a digestão de proteínas e inibir o apetite (SHEPPARD e DIERENFELD, 2002). Uma pesquisa indicou que a adição de inositol e ácido tânico em dietas com baixas concentrações de ferro não teve impacto significativo na redução dos depósitos de ferro hepático em estorninhos (*S. vulgaris*) após 16 semanas de tratamento (OLSEN et al, 2006).

Em mamíferos, o ácido ascórbico, açúcares e aminoácidos podem formar compostos com o ferro que facilitam sua absorção. O ácido ascórbico favorece a redução do ferro na forma férrica para ferrosa, tornando-o mais biodisponível. Esta vitamina também melhora a solubilidade do ferro férrico, formando um complexo solúvel em pH alcalino no intestino (SPELMAN et al., 1989; FAIRBANKS, 1994; HUNT et al, 1994; CRAWSHAW et al., 1995, McDONALD, 2003). Nas aves, o ácido ascórbico e outros ácidos orgânicos podem aumentar a absorção de ferro de fontes não-heme, mas não de fontes heme (CORNELISSEN et al., 1995; SHEPPARD e DIERENFELD, 2002). Porém, um estudo em pombos demonstrou que não houve influência significativa do ácido ascórbico no nível de depósito hepático de ferro (DORRESTEIN et al., 1992).

É possível que a vitamina E contraponha-se aos efeitos tóxicos do ferro e que a diminuição desta vitamina na dieta tenha importância na patogênese da sobrecarga do ferro (SURAI, 2002). Foi sugerido que o excesso de vitamina A em rações de aves de produção possa aumentar a biodisponibilidade do ferro (McDONALD, 2003).

Os sais de cálcio e agentes quelantes podem também reduzir a biodisponibilidade do ferro (CORK, 2000). Níveis elevados de manganês, cobre, cobalto, cádmio e zinco reduzem a absorção de ferro por competição por sítios de ligação (SHEPPARD e DIERENFELD, 2002). Argila alcalina, antiácidos, fitatos, albumina, leite e proteína de soja reduzem a absorção de ferro (SPELMAN et al., 1989; FAIRBANKS, 1994; CORK, 2000). A adição de até 5% de psilium (hemicelulose) na dieta de frangos não afeta a biodisponibilidade de ferro (FLY et al., 1996).

A absorção de ferro heme presente em carnes é três vezes superior ao ferro não-heme presente em alimentos vegetais. Quando se produz rações com subprodutos de origem animal para aves frugívoras e insetívoras, a quantidade absoluta e a biodisponibilidade de ferro são maiores que nas dietas naturais. Isso, associado à alta capacidade de absorção de ferro no trato digestório dessas espécies sensíveis favorece os depósitos de ferro (SHEPPARD e DIERENFELD, 2002).

Em um estudo, dois tucanos-toco (*R. toco*) passaram a receber dieta com menor quantidade de ferro, e foi demonstrada uma redução no depósito de hemossiderina no fígado após 8 e 12 meses de tratamento (REDROBE et al., 2003). Em outro estudo em estorninho (*S. vulgaris*), o simples fornecimento de dieta com baixo nível de ferro, sem qualquer tratamento concomitante por flebotomia ou com quelante, causou redução dos níveis de ferro hepático (OLSEN et al., 2006).

Rações comerciais para aves e mamíferos domésticos podem ter níveis de ferro que variam de 100-500mg/kg (SHEPPARD e DIERENFELD 2002). Com estes níveis, há uma alta probabilidade de ocorrer sobrecarga de ferro em aves frugívoras, insetívoras e nectívoras mantidas em cativeiro.

1.6 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos da hemocromatose são inespecíficos no início da doença e inclui astenia, letargia, fadiga, artralgia, perda de libido ou impotência sexual no homem e amenorréia nas mulheres. Com o passar do tempo podem surgir outras alterações e sintomas como dor abdominal, diabetes mellitus, insuficiência cardíaca congestiva com dilatação ventricular bilateral, arritmia, taquicardia ventricular e

supraventricular, fibrilação ventricular, hiperpigmentação cutânea generalizada (por melanina), poliartrite, esplenomegalia, edema de membros inferiores, ascite, icterícia, hipertensão portal, eritema palmar, telangiectasia, rarefação de pelos, ginecomastia e maior predisposição a infecções. Estes sinais estão relacionados à deposição excessiva de ferro no fígado, pâncreas e coração (SOUZA et al., 2001).

Os sinais clínicos da sobrecarga de ferro em animais são inespecíficos e normalmente estão relacionados com o acometimento do fígado, embora insuficiência cardíaca tenha sido relatada (LOWESTINE e MUNSON, 1999).

Em aves, os sinais da hemocromatose são normalmente subclínicos. Aves da família Ramphastidae podem morrer subitamente sem qualquer sinal. As aves podem estar em boas condições físicas ou magras (WORREL, 1997; SCHMIDT et al., 2003; CUBAS, 2007). Outros sinais clínicos incluem apatia, anorexia, perda de peso, ascite, dispnéia decorrente de ascite, hepatomegalia, cardiomegalia, debilidade progressiva, má aparência das penas e, finalmente, morte (OLSEN et al., 2006; CUBAS, 2007). Em mainás são descritas dispnéia, hepatomegalia e ascite. Pode ocorrer cardiomiopatia em decorrência de siderose no miocárdio (HOEFER, 1997). Uma revisão sobre as mortes de 11 mainás (*Gracula religiosa*), ocorridas no período de 1977 a 1980 em uma instituição nos Estados Unidos, indicou distensão abdominal (10 aves), dispnéia (9), apatia (4), anorexia (4) e diarreia (4). Sinais clínicos menos comuns foram tosse (2), tremores (2), respiração ruidosa (1), regurgitação (1) e polidipsia (1) [RANDELL et al., 1981]. Em um tucano com encefalopatia hepática foram descritas hipofagia, perda de peso, polidipsia, poliúria, diarreia, convulsão e ataxia pós-prandial (SPALDING et al., 1986).

1.7 ALTERAÇÕES ANATOMO E HISTOPATOLÓGICAS

Na hemocromatose hereditária dos seres humanos os estoques aumentados de ferro causam dano tecidual progressivo, em especial no fígado, pâncreas e coração. A peroxidação lipídica e produção de radicais livres lesam as células e provocam fibrose progressiva (SOUZA et al., 2001).

O aspecto macroscópico do fígado de aves afetadas pelo depósito de ferro pode variar, podendo estar aumentado e com cor amarela, marrom ou castanha (WADSWORTH et al., 1983). CUBAS (2007) relatou que a cor do fígado pode variar

de vermelho vivo, sugestivo de congestão, até castanho, indicativo de fibrose e cirrose. Eventualmente ocorrem ascite e edema pulmonar.

As alterações patológicas mais significativas da hemocromatose são fibrose e cirrose hepática, relatadas tanto em aves como em mamíferos selvagens. O risco de neoplasias no fígado é aumentado, tendo sido descritas em aves e lêmures com sobrecarga de ferro (RANDELL et al., 1981; WADSWORTH et al., 1983; SPELMAN et al., 1989; CORK e STOCKDALE, 1995; LOWESTINE e MUNSON, 1999).

Em um estudo histológico em seis mainás (*Gracula religiosa*) que vieram a óbito por doença progressiva, foram encontrados graus variados de colangio-hepatite crônica com fibrose. Todas as aves apresentavam hepatocitomegalia, pigmentos granulares marrons em citoplasma, alterações citoplasmáticas degenerativas, fibrose intersticial, infiltrado celular por mononucleares e macrófagos carregados de pigmentos. A ave que apresentava tecidos mais intensamente pigmentados foi a que teve menor grau de fibrose e infiltração celular. Em todas as amostras havia grânulos de ferro em hepatócitos, células de Kupffer e macrófagos. A maioria das células carregada de ferro estava localizada na região periportal. Alguns grânulos foram vistos em epitélio tubular de rim em três casos. Duas aves apresentaram linfossarcoma sistêmico e carcinoma hepatocelular. Nenhuma amostra corou-se com rodamina, um indicador de cobre em microscopia óptica (RANDELL et al., 1981).

O ferro pode estar presente nos hepatócitos de uma forma granular difusa. Hepatócitos neoplásicos ou presentes em áreas de hiperplasia nodular tendem a apresentar menor quantidade de ferro corado que hepatócitos do parênquima adjacente. Os depósitos de ferro são vistos em células de Kupffer e em agregados de macrófagos carregados de hemossiderina. Esses agregados são normalmente multifocais e podem estar presentes em sinusóides distendidos ou em espaços intersticiais. Em estágios avançados, macrófagos carregados de hemossiderina podem tomar vários lóbulos hepáticos causando perda de parênquima. Septos fibrosos podem estar associados com esses agregados de macrófagos carregados de hemossiderina. Depósitos pequenos a moderados de hemossiderina podem ocorrer em células do epitélio tubular renal e em fagócitos do baço. Em poucos casos são vistos pequenos depósitos de hemossiderina na musculatura cardíaca,

pulmão e tireóide. Carcinoma e adenoma hepatocelular podem ocorrer simultaneamente à hemossiderose/ hemocromatose (WADSWORTH et al., 1983).

Em um estudo anátomo e histopatológico em 20 mainás-de-bali (*Leucopsar rothschildi*) e três mainás comuns (*G. religiosa*) que morreram de causas variadas em três zoológicos nos Estados Unidos no período entre 1981 e 1983, as alterações necroscópicas descritas foram hepatomegalia e ascite em três aves e aumento nodular do fígado com carcinoma hepatocelular em uma ave. Alterações microscópicas no fígado consistiram de fibrose portal leve em três aves com uma delas apresentando proliferação de ducto biliar, moderado infiltrado de heterófilos e poucas células mononucleares. A extensão da fibrose não se correlacionou com a gravidade da deposição de ferro. Em um filhote de um mês foi visto aumento distinto de tecido conectivo fibroso nas áreas portas com pseudolobulação. Fibras finas de colágeno nas imediações da tríade do espaço porta subdividiam o parênquima em hepatócitos isolados ou pequenos grupos de células. Os hepatócitos estavam bem aumentados, com citoplasma transluzente e núcleo pequeno e redondo. A lesão não estava associada à resposta inflamatória. Observou-se acúmulo difuso de grânulos corados por Azul da Prússia (AP) no citoplasma de hepatócitos, variando de leve, moderado a grave, havendo, proporcionalmente, mais deposição de hemossiderina hepática em aves que estavam mais tempo em cativeiro. Filhotes de um a três dias não apresentavam hemossiderina corada no fígado. Células de Kupffer coradas estavam ausentes na maioria das aves, exceto na ave que apresentou colangiohepatite aguda, em que pigmentos de ferro corados eram evidentes na região periportal. Em mainás, pigmentos corados por AP foram também vistos no epitélio tubular do rim (12 aves), no coração (três aves) e pulmão (duas aves). O fígado, intestino e pâncreas foram negativos para a coloração AP. As células neoplásicas do carcinoma hepatocelular, vistas em uma das aves, coraram-se pouco ou não se coraram com AP, contrariamente aos hepatócitos não neoplásicos e macrófagos nas margens do tumor, que coraram. Nesse mesmo estudo, não foram encontrados depósito de ferro em células de Kupffer e em células do sistema mononuclear-fagocitário do baço de mainás, diferentemente do que ocorreu em aves adultas de outras 14 ordens, que apresentaram hemossiderina nestas células e também em hepatócitos. Os autores concluíram que essas diferenças podem indicar

particularidades no metabolismo do ferro em mainás comparativamente a outros grupos de aves (GOSSELIN e KRAMER, 1983).

Em um estudo histológico em tucano-toco (*R. toco*) com encefalopatia hepática associada à hemocromatose, foram encontrados pigmentos corados por AP e vários vacúolos na maioria dos hepatócitos. Havia vários grânulos no citoplasma dos hepatócitos (com distribuição pericanalicular), células de Kupffer, macrófagos esplênicos (em pequenos agregados pequenos), na maioria das células epiteliais dos túbulos renais, em folículos ovarianos atrésicos, e em alguns macrófagos nas meninges. Foi também vista leve deposição de hemossiderina nas células da medula adrenal, na túnica íntima de alguns vasos, e em miócitos subepicárdicos. Não foram vistos pigmentos corados na medula óssea, pâncreas, hipófise, pele, espaço sinovial, glândulas submucosas, nem em epitélio intestinal. Estavam presentes na maioria dos hepatócitos vacúolos claros e eosinofílicos de vários tamanhos, e normalmente envolvidos por um halo claro, que levou os autores a reconhecê-los como autofagossomos. Com coloração AP estes autofagossomos coraram-se em várias tonalidades de azul. Outros achados foram hiperplasia generalizada de tecido hematopoiético na medula óssea, depleção linfóide esplênica, proventriculite, ventriculite, enterite, e meningoencefalite multifocal crônica (SPALDING et al., 1986).

Nesse mesmo estudo de SPALDING et al. (1986), a análise por microscopia eletrônica indicou que os siderossomos em hepatócitos e células de Kupffer apresentavam glóbulos eletrodensos sugestivos de hemossiderina e grânulos eletrodensos sutis indicativos de ferritina. A ferritina está dispersa no citosol dos hepatócitos em autofagossomos e em células de Kupffer. Os autofagossomos são compostos de material flocular ligado à membrana, medianamente eletrodensos, que algumas vezes contêm figuras de mielina e ferritina, esparsa a densamente agregadas. Pigmentos biliares foram observados nos hepatócitos e nos sinusóides, na forma de grânulos. Inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas e intranucleares foram identificadas em grupos de hepatócitos por todo o fígado, que pela localização ultra-estrutural e característica morfológica, foram identificadas como glicogênio (SPALDING et al., 1986).

WARD et al. (1988) fizeram um estudo analítico e morfológico de amostras de fígado de 40 aves de diversas ordens, que vieram a óbito no período de julho de

1985 a junho de 1986 na Sociedade de Zoológico de Londres. Aves da ordem Passeriformes apresentaram concentração de ferro hepático de 18 a 230 μ mol de Fe/g de tecido. Nas amostras com menor concentração de ferro o estudo histológico indicou agregados de materiais densamente corados e também ferro difuso em parênquima, principalmente na região periportal e na zona-1 do ácino. Não foi vista fibrose nem evidência de danos ultra-estruturais, a não ser o excesso de ferro. Nas amostras com maior concentração de ferro foram vistas mudanças morfológicas compatíveis com as que ocorrem na hemocromatose hereditária humana. Ainda nesse estudo, aves da ordem Anseriformes e Strigiformes apresentaram depósito de ferro em parênquima hepático, com pouca deposição em células do sistema mononuclear-fagocítico. Contudo, três aves da ordem Coraciiformes (atualmente desmembrada e que deu origem à ordem Bucerotiformes, os calaus) que tiveram menor concentração de ferro hepático (até 100mmol de Fe/g de tecido) apresentaram grave fibrose periportal e também formação de nódulos circundados por tecido conjuntivo e ausência de uma veia central (WARD et al., 1988).

Na pesquisa de WARD et al. (1988) a análise por microscopia eletrônica demonstrou intensa citossiderose nas células parenquimais, com várias partículas de ferritina aleatoriamente dispersas no citosol ou isoladas em lisossomos. Nessas organelas foram identificadas partículas de ferritina; porém, a maior parte do depósito de ferro eletrodenso estava na forma de agregados de hemossiderina.

1.8 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da hemocromatose hereditária nos seres humanos é feito pelos sintomas e exames específicos, que incluem análises bioquímicas indicativas do metabolismo do ferro, biópsia hepática, e teste para a detecção de mutações genéticas (SOUZA et al., 2001).

No diagnóstico *ante-mortem* da hemocromatose em aves, são as evidências que levam o clínico a suspeitar da doença, levando-se em conta os sinais clínicos, anamnese, bioquímica sérica e exames por imagem (radiografia, ultra-sonografia e endoscopia), mas o diagnóstico só pode ser confirmado pelo exame histopatológico do fígado e de outros órgãos, a partir da coleta de amostras de tecido por biópsia ou necropsia (CUBAS, 2007).

Exames radiológicos e ultra-sonográficos não invasivos podem fornecer informações úteis para fundamentar a suspeita clínica, indicando hepatomegalia e alteração no parênquima hepático, porém, não são conclusivos. As alterações que podem ser percebidas em radiografia são hepatomegalia e ascite (WHITESIDE, 2001; CUBAS, 2003). RANDELL et al. (1981) relataram que exames radiológicos em nove mainás (*G. religiosa*) que sofriam de hemocromatose indicaram hepatomegalia, e sete aves também apresentaram ascite (RANDELL et al., 1981).

Foi realizada abdominocentese em cinco mainás (*G. religiosa*) com sobrecarga por ferro, tendo-se obtido fluido amarelado caracterizado como exsudato. Macrófagos e células mononucleares estavam presentes e a densidade das amostras variou de 1.013 a 1.018 (RANDELL et al., 1981).

Exames hematológicos e testes de bioquímica sérica apresentam limitado valor no diagnóstico da siderose hepática, pois nem sempre se elevam. Os ácidos biliares estão também inalterados na maioria dos casos (FUDGE, 2000). Em aves, os metabólitos e enzimas mais indicados para avaliar a função hepática são desidrogenase láctica (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e ácidos biliares. As provas específicas para avaliar a sobrecarga por ferro são nível de ferro sérico, transferrina sérica, capacidade total de ligação do ferro (TIBC), e índice de saturação da transferrina (IST) [LOWESTINE e MUNSON, 1999; FUDGE, 2000; CUBAS, 2003].

A alanina aminotransferase (ALT), por sua baixa atividade no fígado e por estar presente em vários tecidos, tem uso limitado como indicador de lesão hepática nas aves. A gama-glutamilttransferase (GGT) é uma enzima de alta especificidade e baixa sensibilidade para doenças hepáticas. A fosfatase alcalina (FA) não é um bom indicador de doença hepática em pombo, calopsita (*Nymphicus hollandicus*), gavião-de-cauda-branca (*Buteo jamaicensis*) e coruja-mocho (*Bubo virginianus*). A glutamato desidrogenase (GDH) é uma enzima mitocondrial de baixa sensibilidade, que só se eleva em alguns tipos de lesão hepática severa. A degeneração celular hepática com derrame de conteúdo citoplasmático não eleva a atividade da GDH. A creatinacinase (CK) está presente em músculo estriado em grande quantidade e também em músculo cardíaco e liso e serve como indicador de lesão muscular quando níveis de AST estão também aumentados (LUMEIJ, 1997; FUDGE, 2000).

Nas doenças hepáticas avançadas, quando pode haver cirrose, os valores das enzimas séricas que indicam a atividade hepática podem estar normais em razão de não estar mais ocorrendo lesão celular (LUMELJ, 1997).

A dosagem do ferro sérico não é confiável no diagnóstico ou prevenção da hemocromatose, pois os valores variam muito entre aves acometidas e saudáveis. Além disso, uma hemólise pode elevar os níveis de ferro plasmático além de 300mg/dL, valor antes considerado indicativo de hemocromatose em aves (WORELL, 1991; FUDGE, 2000).

As provas de bioquímica sérica em seis mainás (*G. religiosa*) com hemocromatose indicaram alterações interpretadas como baixa proteína total (4/4, ou seja, 4 em 4 amostras), elevação de bilirrubina total (3/4), e alta atividade de AST (6/6), ALT (3/3), LDH (6/6), e AP (1/4) (RANDELL et al., 1981). Porém, considerando os valores de referência atuais para essa espécie (TEARE, 2002), os resultados apresentados naquela publicação podem ser considerados normais, exceto a proteína sérica total, cujos valores estão um pouco abaixo do limite inferior em três de quatro amostras. Hipoalbuminemia pode realmente ocorrer em razão de insuficiência hepática (CUBAS, 2001).

O IST (índice de saturação de transferrina) é o teste mais sensível para a identificação fenotípica de homozigose para a hemocromatose hereditária nos seres humanos. O teste pode ser calculado a partir do quociente entre o ferro sérico ($\mu\text{g/dL}$) e a capacidade total de ligação de ferro (CTLF), em $\mu\text{g/dL}$, multiplicado por 100. Considera-se que a combinação da IST superior a 45% e a ferritina sérica elevada apresentam sensibilidade de 93% para o diagnóstico da hemocromatose hereditária na espécie humana (SOUZA et al., 2001). Porém, os valores de IST para animais selvagens precisam ser mais bem definidos para a maioria das espécies. O IST determinado para tucano-toco (*Ramphastos toco*), a partir de doze espécimes foi 27% (variação de 20 a 33%) e a CTLF foi 389 $\mu\text{g/dL}$ (variação de 348-430 $\mu\text{g/dL}$) [GOULART e CUBAS, 2002]. Como o teste para a ferritina sérica não está disponível para aves silvestres por ser uma prova imunomediada (LOWESTINE e MUNSON, 1999, FUDGE, 2000), apenas o IST pode ser empregado até o momento como prova auxiliar no diagnóstico da hemocromatose aviária.

A biópsia hepática é ainda considerada o método de diagnóstico mais preciso, pois permite visualizar e quantificar os depósitos de ferro em tecidos e as alterações

histopatológicas decorrentes. Infelizmente, é um procedimento invasivo que requer anestesia geral e que oferece risco aos pacientes, principalmente os debilitados, que podem estar com doença hepática e distúrbios da coagulação (CUBAS, 2001). Em aves, amostras de fígado podem ser obtidas por biópsia realizada por endoscopia ou fazendo-se uma pequena incisão na porção ventral do abdômen como via de acesso para a agulha de biópsia (WORELL, 2000; RODENBUSCH, 2004). Pode ser feita a análise quantitativa do depósito de ferro por histomorfometria, empregando programas de computador para a análise de imagens (ROELS et al., 1996; DREWS et al., 2004; ORTEGA et al., 2005), ou pode-se fazer a quantificação química de ferro na amostra de tecido hepático pelas técnicas de colorimetria e espectrofotometria de absorção atômica (LOWESTINE e MUNSON, 1999). Biópsia hepática guiada por ultra-som é descrita em aves, tendo sido realizada em 30 pombos domésticos e 30 codornas domésticas. Em razão de particularidades anatômicas, o acesso nos pombos foi lateral e nas codornas ventromedial (ZEBISCH et al, 2004).

1.9 TERAPÊUTICA

A terapêutica da hemocromatose, tanto nos seres humanos como nos animais, consiste basicamente da retirada de ferro do eritron por flebotomia ou mobilização do ferro depositado em órgãos parenquimatosos e sistema mononuclear-fagocitário com quelantes (LOWESTINE e MUNSON, 1999).

O fornecimento de dieta com baixos níveis de ferro é a primeira medida a ser tomada em casos de aves suspeitas de sobrecarga de ferro. Em um estudo em dois tucano-toco (*R. toco*) que apresentavam hemocromatose, foi oferecida dieta com baixa concentração de ferro (menos de 100ppm) durante oito meses. Houve redução significativa dos depósitos de ferro após o tratamento, constatada por análise da quantidade de hemossiderina hepática por histomorfometria (DREWS et al., 2004). O estudo experimental de OLSEN et al. (2006) em estorninhos (*S. vulgaris*) também indicou redução do nível de hemossiderina no fígado após o fornecimento de dieta com baixo nível de ferro por 16 semanas.

O tratamento mais antigo e usual para a hemocromatose em pessoas é a retirada periódica de sangue por venissecção, de modo a estimular a hematopoiese

e movimentar o estoque de ferro em órgãos parenquimatosos (SOUZA et al., 2001). Nos seres humanos, a retirada de 500mL de sangue causa a perda de aproximadamente 200-250mg de ferro. A flebotomia visa manter a ferritina sérica abaixo de 50µg/L e a saturação da transferrina abaixo de 35% (WHITESIDE, 2001). Vários estudos indicam que o tratamento causa evidente melhora da sobrevida dos pacientes, sendo que a maioria dos autores preconiza flebotomias semanais ou quinzenais de 500mL durante meses até dois a três anos, conforme a tolerância de cada indivíduo, e até que os estoques de ferro estejam baixos. Para monitorar o grau de deposição de hemossiderina, recomenda-se realizar a dosagem de ferritina sérica e IST a cada dois a três meses ou a cada 1-2g de ferro removido. A hemoglobina deve ser dosada antes de cada sangria, devendo situar-se em torno de 11g/dL. A manutenção do tratamento é feita com sangria de 500mL a cada 3 a 4 meses por toda a vida ou a intervalos mais curtos, conforme o caso (SOUZA et al., 2001).

Tratamentos de hemocromatose por flebotomia ou com quelantes, com diferentes graus de sucesso, são também descritos em aves e animais domésticos (PEARSON et al., 1994; MORRIS et al., 1989; LAVOIE e TEUSCHER, 1993; CORNELISSEN et al., 1995; REDROBE et al., 2003; WHITESIDE et al., 2004; OLSEN et al., 2006).

Em dois tucanos que apresentavam hemocromatose, foram realizadas flebotomias semanais com a retirada de sangue em volume equivalente a 1% do peso da ave (WORELL, 1991a). recomenda-se que durante o tratamento sejam realizadas biopsias hepáticas seriadas para acompanhar a redução dos depósitos de ferro ao longo do tratamento (LOWESTINE e MUNSON, 1999). Outro protocolo sugerido para tratar tucanos é a sangria diária de 1-2mL até que ocorra melhora clínica ou se atinja o limite inferior do intervalo de normalidade do hematócrito da espécie, que deve ser medido a cada flebotomia. A partir da melhora clínica, retira-se semanalmente sangue em volume equivalente a 1% do peso da ave (RUPLEY e OLIVEIRA, 1999; WORELL, 2000).

Os quelantes de ferro são empregados para a mobilização do mineral depositado em órgãos parenquimatosos. A desferoxamina (DFO) tem sido usada por quatro décadas no tratamento de sobrecarga de ferro nos seres humanos (COHEN, 2006). A DFO liga-se ao ferro e alumínio na proporção molecular de 1:1; faz a

quelação de ferro lábil e de ferro estocado como ferritina e hemossiderina, formando o complexo solúvel e estável ferrioxamina, que é excretado pela urina e fezes. A DFO não remove o ferro da hemoglobina, transferrina ou de enzimas em grupo heme (HOFFBRAND e WONKE, 1997; OLIVIERI e BRITTENHAM, 1997; KONTOGHIORGHES et al., 2000). A meia-vida da DFO é de 5-10 minutos por via endovenosa. Por infusão subcutânea contínua atinge maior nível plasmático após 4-6h (KONTOGHIORGHES, 1995). A DFO tem como inconveniente o uso parenteral, devendo ser aplicada por via subcutânea (SC) ou endovenosa (EV). A via intramuscular não fornece melhores resultados que as vias SC e EV. Na maioria dos pacientes a DFO é aplicada por via SC em bombas de infusão, durante 8-12 horas/dia, pelo menos cinco dias por semana, com dose total de 20-60mg/kg/dia (KONTOGHIORGHES et al., 2000; COHEN et al., 2000). Porém, a infusão SC *in bolus* pode ser tão eficiente quanto a administração prolongada (BORGNA-PIGNATTI e COHEN, 1997). Os efeitos tóxicos da DFO nos seres humanos incluem neurotoxicidade ocular, auditiva e cerebral, reversíveis após cessar o tratamento; lesão alveolar aguda por hipersensibilidade, reações cutâneas locais, pancitopenia e aumento na excreção de zinco, cobre, sódio e cálcio. O risco de infecções bacterianas e fúngicas aumenta durante o tratamento (WHITESIDE, 2001; LOWESTINE e MUNSON, 1999). Há poucos relatos de uso de DFO em animais, tendo sido utilizada em aves silvestres com sucesso em poucas ocasiões (LOOMIS e WRIGHT, 1993; CORNELISSEN et al., 1995).

A deferiprona, o primeiro quelante de uso oral, tem sido usada no tratamento de pacientes humanos com talassemia e outras doenças por sobrecarga de ferro (COHEN, 2006). A deferiprona liga-se ao ferro na proporção de 3:1, respectivamente, para formar um complexo neutro que é excretado na urina das pessoas e na bile dos ratos. A deferiprona liga-se ao ferro da transferrina, ferritina, hemossiderina e ao ferro lábil. A absorção é rápida no estômago e intestino delgado. É metabolizada principalmente no fígado (mais de 85%) e é rapidamente eliminada num período entre 47-143 minutos em pacientes com sobrecarga de ferro (BARMAN-BALFOUR e FOSTER, 1999; KONTOGHIORGHES et al., 2000; WHITESIDE, 2001). A deferiprona apresenta boa capacidade de remoção de ferro cardíaco (COHEN, 2006). Em estudos em ratos, coelhos e cães normais ou com sobrecarga de ferro, a meia-vida variou de 40-100 minutos (RAHMAN et al., 1992;

FREDENBURG et al., 1993; FREDENBURG et al, 1996). O efeito adverso mais grave da deferiprona no ser humano é uma neutropenia transitória e/ou agranulocitose, que pode ocorrer até seis semanas após o início do tratamento. Este efeito ocorre em menos de 1% dos pacientes que realizam controles com hemogramas semanais e é reversível com a interrupção do tratamento (COHEN, 2006). A deferiprona pode ligar-se ao alumínio, cobre e zinco, mas em apenas 1-3% dos pacientes foi notada deficiência de zinco. Outros efeitos secundários são dor articular (15%) e sintomas gastrintestinais (até 30%). A agranulocitose aumenta o risco de sepse (WHITESIDE, 2001; COHEN, 2006).

Apenas um estudo farmacocinético relata o uso de deferiprona em aves para tratar hemossiderose artificialmente induzida em galinhas *leghorn* e pombos domésticos. Na pesquisa foi utilizada a dose de 50mg/kg. O pico de concentração sérica do fármaco ocorreu após aproximadamente uma hora e a meia-vida foi de três horas. Após 30 dias de tratamento, a deferiprona eliminou o estado de sobrecarga de ferro nas aves estudadas. Os efeitos adversos descritos foram deficiência de zinco, perda de peso e morte por redução acentuada dos estoques de ferro (WHITESIDE, 2001; WHITESIDE et al., 2004).

O uso combinado de deferoxamina e deferiprona reduz mais rapidamente os depósitos de ferro cardíaco e hepático do que o emprego da deferoxamina sozinha, e outra vantagem é que a toxicidade não aumenta. A combinação destes fármacos no tratamento de pacientes humanos que recebem transfusão de sangue regular é indicada (WONKE et al., 1988; GRADY et al., 2002; KATTAMIS et al., 2006; TANNER et al., 2007).

O deferassirox, um novo quelante oral de ferro, tem sido utilizado para tratar sobrecarga de ferro crônica por transfusão sangüínea em pessoas. Três moléculas de deferassirox ligam-se a uma molécula de ferro. A meia-vida é de 8-16 horas e a dose é 20-30mg/kg/dia. A excreção ocorre principalmente pelas fezes. Tem como vantagens ser de uso oral, necessitar de apenas uma administração diária, e em doses elevadas ter efeito equivalente à desferoxamina (COHEN, 2006).

Um estudo comparativo entre deferassirox e deferiprona foi realizado em 28 gerbils (*Rodentia*, *Muridae*) com depósito de ferro induzido experimentalmente com aplicações semanais de ferro dextran. O estado de deposição de ferro no miocárdio e fígado foi avaliado em cinco animais antes dos protocolos terapêuticos e os

animais restantes foram tratados com deferasirox (100mg/kg/dia PO divididos QID) e deferiprona (375mg/kg/dia PO divididos TID), cinco dias por semana durante 12 semanas. O deferasirox reduziu os depósitos de ferro em miocárdio de gerbils na proporção de 20,5% e no fígado em 51%; e a deferiprona reduziu em 18,6% e 24,9% na musculatura cardíaca e fígado, respectivamente (WOOD et al., 2006).

Os estudos sobre terapêutica da hemocromatose em aves são escassos e a informação que se dispõe é normalmente resultado da experiência clínica de alguns autores. Um estudo experimental recentemente realizado em estorninhos europeus (*S. vulgaris*) com sobrecarga de ferro induzida experimentalmente com alimento contendo altos níveis de ferro (3235ppm) demonstrou os benefícios da flebotomia e tratamento com quelantes de ferro. Após a sobrecarga de ferro induzida, todas as aves passaram a receber dieta com baixos níveis de ferro (32-48ppm), tendo sido separadas em quatro grupos com protocolos terapêuticos distintos: grupo 1 - somente dieta com baixo nível de ferro; grupo 2 - dieta com fitato (inositol) e ácido tânico; grupo 3 - deferoxamina na dose de 100mg/kg/dia SC; e grupo 4 – flebotomia semanal, retirando-se sangue na proporção de 1% do peso das aves. Os tratamentos duraram 16 semanas. Os resultados obtidos indicaram que tanto o tratamento por flebotomia como com deferoxamina reduziu a concentração de ferro hepático não-heme para níveis considerados seguros (190ppm/semana e 163ppm/semana, respectivamente). O protocolo que consistia de apenas dieta com baixa concentração de ferro reduziu os depósitos em fígado a uma taxa menor (45ppm/semana); enquanto que a adição de inositol e ácido tânico à dieta com baixa concentração de ferro não apresentou diferença significativa na concentração do ferro depositado no fígado em relação ao grupo controle (OLSEN et al., 2006).

1.10 PREVENÇÃO

O tratamento da hemocromatose em animais é prolongado e de resultados imprevisíveis. No momento em que os animais acometidos passam a apresentar sinais clínicos, a doença pode estar em estágio avançado com lesões irreversíveis e prognóstico ruim. Portanto, o diagnóstico precoce da sobrecarga hepática por ferro e o correto manejo alimentar de animais de espécies suscetíveis são medidas eficazes no controle da doença.

Espécies suscetíveis devem receber dietas com baixas concentrações de ferro. Os níveis dietéticos desejáveis de ferro não são conhecidos para a maioria das espécies silvestres, havendo, muitas vezes, extrapolação das necessidades determinadas para espécies domésticas. Os níveis de ferro recomendados para espécies suscetíveis devem ser inferiores a 65mg/kg de matéria seca (DIERENFELD et al., 1994; LOWESTINE e MUNSON, 1999; CUBAS, 2001; SHEPPARD e DIERENFELD, 2002). Pode haver certa dificuldade em preparar dietas com menos de 100ppm de ferro, em razão da dificuldade em se balancear outros nutrientes. Além disso, poder haver a adição indevida de ferro durante o processo de produção ou ferro oculto no premix (GOSSELIN e KRAMER, 1983; CRAWSHAW et al., 1995).

Alimentos com baixas concentrações de ferro podem ser usados na formulação de dietas *in natura*, incluindo iogurte, clara de ovo cozida, batata fervida, milho, trigo, maçã, banana, pêra, abacaxi, figo, mamão e melão (CARCIOFI e OLIVEIRA, 2007).

É uma medida recomendada para aves sensíveis a adição à dieta de quelantes naturais como taninos, fibras e fitatos (SPELMAN et al., 1989; DIERENFELD et al., 1994; LOWESTINE e MUNSON, 1999; SEIBELS et al., 2003; CARCIOFI e OLIVEIRA, 2007). Em um estudo em estorninhos (*S. vulgaris*) de vida livre, foi demonstrado que a siderose hepática aumentou significativamente em um grupo de aves que consumiu dieta rica em ferro por seis meses, enquanto que em outro grupo mantido pelo mesmo período com dieta rica em ferro, mas com a adição de folhas de chá preto (rico em tanino), não houve aumento significativo da concentração de ferro hepático (SEIBELS et al., 2003). Proteína de origem animal deve ser evitada na alimentação dos tucanos, pois o ferro-heme é mais biodisponível. Recomenda-se vitamina C na dose de 100mg/kg de matéria seca. Uma sugestão é oferecer alimentos ricos em vitamina C em horário de alimentação diferente do que é fornecido alimentos com maior disponibilidade de ferro, evitando-se o efeito da vitamina C na promoção da absorção do ferro (SHEPPARD e DIERENFELD, 2002).

1.11 REFERÊNCIAS

ALLEN, M.E.; MONTALI, R.J. Nutrition and disease in zoo animals. **Verh. Be. Erkr. Zootiere**, v.37, p.215-231, 1995.

ANDREWS, G.A.; CHAVEY, P.S.; CRAWFORD, G. Enzyme-linked immunosorbent assay to quantitate serum ferritin in black and white ruffed lemurs (*Varecia variegata variegata*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.36, n.4, p.648-652, 2005.

BARMAN-BALFOUR, J.A.; FOSTER, R.H. Deferiprone: a review of its clinical potential in iron overload in P-thalassaemia major and other transfusion dependent diseases. **Drugs**, v.58, p.553-578, 1999.

BONAR, C.J.; TRUPKIEWIEZ, J.G.; TODDES, B.L.; ALBERT, H. Iron storage disease in tapirs. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.37, n.1, p.49-52, 2006.

BORCH-IOHNSSEN, B.; HOLM, H.; JORGENSEN, A.; HORHEIM, G. Seasonal siderosis in female eider nesting in Svalbard. **Journal of Comparative Pathology**, v.104, p.7-15, 1991.

BORCH-IOHNSSEN, B.; NILSSEN, K.J. Seasonal iron overload in Svalbard reindeer liver. **Journal of Nutrition**, v.117, p.2072-2078, 1987.

BORGNA-PIGNATTI, C.; COHEN, A.R. Evaluation of a new method of administration of the iron chelating agent deferoxamine. **Journal of Pediatrics**, v.130, p.86-88, 1997.

CARCIOFI, A.C.; OLIVEIRA, L.D. Doenças Nutricionais. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora Roca, 2007, p.838-864.

CARTHEW, P.; EDWARDS, R.E.; DORMAN, B.M. Hepatic fibrosis and iron accumulation due to endotoxin-induced haemorrhage in the gerbil. **Journal of Comparative Pathology**, v.104, p.301-311, 1991.

COHEN, A.R. New advances in iron chelation therapy. In: BERLINDER, N.; LINKER, C.; SCHIFFER, C.A.; BAJUS, J.L. **Hematology, Education Program Book**, 2006, p.42-47. Disponível em <http://www.asheducationbook.org>.

COHEN, A.R.; GALANELLO, R.; PIGA A.; DIPALMA, A.; VULLO, C; TRICTA, F. Safety profile of the oral iron chelator deferiprone: a multicenter study. **British Journal of Haematology**, v.108, p.305-312, 2000.

CORK, S.C. Iron storage diseases in birds. **Avian Pathology**, v.29, p.7-12, 2000.

CORK, S.C.; ALLEY, M.R.; STOCKDALE, P.H.G. A quantitative assessment of haemosiderosis in wild and captive birds using image analysis. **Avian Pathology**, v.24, p.239-254, 1995.

CORK, S.C.; STOCKDALE, P.H.G. Carcinoma with concurrent haemosiderosis in an Australian bittern (*Botaurus poiciloptilus*). **Avian Pathology**, v.24, p.207-213, 1995.

CORNELISSEN, H.; DUCATELLE, R.; ROELS, S. Successful treatment of a channel-billed toucan (*Ramphastos vitellinus*) with iron storage disease by chelation therapy: sequential monitoring of the iron content of the liver during the treatment period by quantitative chemical and image analyses. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, 1995, v.9, p.131-137.

CORNELISSEN, H.; RITCHIE, B.W. Ramphastidae. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. (Ed.). **Avian Medicine: Principles and Application**. Lake Worth, FL: Wingers Publishing, Inc, 1994, p.1276-1283.

COSTA, A.L.M ; CATÃO-DIAS, J.L. Estudo morfométrico da hemossiderose em aves silvestres. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.19, n.113, p.67-70, 2000.

CRAWSHAW, G.J.; OYARZUN, S.; VALDES, E.; ROSE, K. Hemochromatosis (iron storage disease) in fruit bats. **Proceedings of the American Zoological Association Nutrition Advisory Group**, p.136-147, 1995.

CRISSEY, S.D.; WARD, A.M.; BLOCK, S.E.; MASLANKA, M.T. Hepatic iron accumulation over time in European starlings (*Sturnus vulgaris*) fed two levels of iron. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.31, n.4, p.491-496, 2000.

CUBAS, Z.S. Medicine: Family Ramphastidae (Toucans). In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. (Ed.). **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press, 2001, p.188-199.

CUBAS, Z.S. Piciformes (tucanos, araçaris, pica-paus). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora Roca, 2007, p.210-221.

CUBAS, Z.S. Piciformes (Woodpeckers, Barbets, Puffbirds, Jacamars, Toucans). In: FOWLER, M.E.; MILLER, R.E. **Zoo and Wild Animal Medicine**, 5th ed. St. Louis, Missouri: Saunders. 2003, p.261-266.

DIERENFELD, E.S.; PINI, M.T.; SHEPPARD, C.D. Hemosiderosis and dietary iron in birds. **The Journal of Nutrition**, v.124, p.2685-2686, 1994.

DORRESTEIN, G.M.; GRINWIS, G.M.; DOMINGUEZ, L., et al. An induced iron storage disease syndrome in doves and pigeons: A model for hemochromatosis in mynah birds. **Proceedings of the Association of Avian Veterinarians**, New Orleans, 1992, p.108-112.

DREWS, A.V.; REDROBE, S.P.; PATTERSON-KANE, J.C. Successful reduction of hepatocellular hemosiderin content by dietary modification in toco toucans (*Ramphastos toco*) with iron-storage disease. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.18, n.2, p.101-105, 2004.

FAIRBANKS, V.F. Iron in medicine and nutrition. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (eds.), **Modern Nutrition in Health and Disease**. Maivem, Pennsylvania: Lea and Febiger, 1994, p.185-213.

FARINA, L.L.; HEARD, D.J.; LeBLANC, D.M.; HALL, J.O.; STEVENS, G.; WELLEHAN, J.F.X.; DETRISAC, C.J. Iron storage disease in captive Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*): Relationship of blood iron parameters to hepatic iron concentrations and hepatic histopathology. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.36, p.2, p.212-221, 2005.

FEDER, J.N.; GNIRKE, A.; THOMAS, W.; TSUCHIHASHI, Z.; RUDDY, D.A.; BASAVA, A.; DORMISHIAN F.; DOMINGO R.; ELLIS M.C.; FULLAN, A.; HINTON, L.M.; JONES, N.L.; KIMMEL, B.E.; KRONMAL, G.S.; LAUER, P.; LEE, V.K.; LOEB, D.B.; MAPA, F.A.; MCCLELLAND, E.; MEYER N.C.; MINTIER, G.A.; MOELLER, N.; MOORE, T.; MORIKANG, E.; PRASS, C.E.; QUINTANA, L.; STARNES, S.M.; SCHATZMAN, R.C.; BRUNKE, K.J.; DRAYNA, D.T.; RISCH, N.J.; BACON, B.R.; WOLFF, R.K. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. **Nature Genetics**, v.13, p.399-408, 1996.

FLY, A.D.; CZARNECKI-MAULDEN, G.L.; FAHEY Jr., G.C.; TITGEMEYER, E.C. Hemicellulose does not affect iron bioavailability in chicks. **Journal of Nutrition**, v.126, n.1, p.308-316, 1996.

FRANKENHUIS, M.T.; Van EYK, H.; ASSINK, J.A.; ZWART, P. Iron storage in livers of birds of paradise. **Proc 2nd Eur Symp Avian Med Surg**, Utrecht, Netherlands, 1989, p.92-96.

FRANKENHUIS, M.T.; ASSINK, J.A. Iron accumulation in the livers of birds of paradise. **British Veterinary Zoological Society Newsletter**, v.12, p.2, 1981.

FREDENBURG, A.M.; SETHI, R.K.; ALLEN, D.D.; YOKEL, R.A.. The pharmacokinetics and blood-brain barrier permeation of the chelators 1,2 dimethyl-, 1,2 diethyl-, and 1-[ethan-1'ol]-2-methyl-3-hydroxypyridin-4-one in the rat. **Toxicology**, v.108, p.191-199, 1996.

FREDENBURG, A.M.; WEDLUND, P.J.; SKINNER, T.L.; DAMANI, L.A.; HIDER, R.C.; YOKEL, R.A. Pharmacokinetics of representative 3-hydroxypyridin-4-ones in rabbits: CP20 and CP94. **Drug Metabolism and Disposition**, v.21, p.255-258, 1993.

FRYE, D.M.; LOWESTINE, L.J. Pathology of common murrelets and Cassin's auklets exposed to oil. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v.14, p.725-737, 1985.

FUDGE, A.M. Avian liver and gastrointestinal testing. In: _____ **Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000a, p.47-55.

FUDGE, A.M. Avian metabolic disorders. In _____ **Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000b, p.56-60.

GARCIA, F.; RAMIS, J.; PLANAS, J. Iron content in starlings, *Sturnus vulgaris*. **Comparative biochemistry Physiology**, v.77A, p.651-654, 1984.

GLENN, K.M.; CAMPBELL, J.L.; ROTSTEIN, D.; WILLIAMS, C.V. Retrospective evaluation of the incidence and severity of hemosiderosis in a large captive lemur population. **American Journal of Primatology**, v.68, n.4, p.369-381, 2006.

GOSSELIN, S. J.; KRAMER, L. Pathophysiology of excessive iron storage in mynah birds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.183, p.1238-1240, 1983.

GOULART, C.E.S.; CUBAS, Z.S. Determinação de valores séricos de ferro, ferritina, capacidade total de ligação de ferro e índice de saturação de transferrina em *Ramphastos toco* (Tucano-toco). XXVI Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil e II Encontro de Zoológicos do Mercosul, 2002. Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade de Zoológicos do Brasil, 2002, p.17.

GRADY R.W.; BERDOUKAS, V; RACHMILEWITZ, E.A. et al. Combinations of desferoxamine and deferiprone markedly enhance iron excretion. **Blood**, v.100, p.241, 2002.

GRINER, L.A. **Pathology of Zoo Animals**. San Diego: Zoological Society of San Diego, 1983, p.251-264.

HOEFER, H.L. Disease of the gastrointestinal tract. In: ALTMAN, R.B.; CLUBB, S.L.; DORRESTEIN, G.M.; QUESENBERRY, K. **Avian Medicine and Surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997, p.446-447.

HOFFBRAND, A.V.; B. WONKE. Iron chelation therapy. **Journal of Internal Medicine Supplement**, v.740, p.37-41, 1997.

HOUSE, J.K.; SMITH, B.P.; MAAS, J.; LANE, V.M.; ANDERSON, B.C.; GRAHAN, T.W.; PINO, M.V. Hemochromatosis in Salers cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.8, n.2, p.105-111, 1994.

HUNT, J.R.; GALLAGHER, S.K.; JOHNSON, L.K. Effect of ascorbic acid on apparent iron-absorption by women with low iron stores. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.59, p.1381-1385, 1994.

JARAMILLO, E.; SCHLATTER, R.; CONTRERAS, H.; DUARTE, C.; QUIROZ, E.; PALMA, H.; ULLOA, J.; PAREDES, E.; VALENZUELA, G. **Estudio sobre origen de mortalidades y disminución poblacional de aves acuáticas en el santuario de la naturaleza Carlos Andwanter en la Provincia de Valdivia**. Universidad Austral de Chile .15 Diciembre, 2004. Disponível em: http://www.emol.com/noticias/documentos/pdfs/cisnes_mortalidad_final.pdf. Acesso em: 7 out. 2007.

KATTAMIS, A. ; LADIS, V. ; BERDOUSI, H.; KELEKIS, N.L.; ALEXOPOULOU, E.; PAPASOTIRIOU, I.; DRAKAKI, K.; KALOUMENOU, I.; GALANI, A.; KATTAMIS, C.

Iron chelation treatment with combined therapy with deferiprone and deferoxamine: a 12-month trial. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v.36, p.21–25, 2006.

KELLY, W.R. The liver and biliary system. In: JUBB, KVF; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. (eds.). **Pathology of Domestic Animals**, 4.ed., v.2, San Diego: Academic Press, p.319-406, 1993.

KINCAID, A. L. & STOSKOPF, M. K. Passerine dietary iron overload syndrome. **Zoo Biology**, v.6, p.79-88, 1987.

KOCK, N.; FOGGIN C.; KOCK, M.D.; KOCK, R. Hemosiderosis in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*): A comparison of free-ranging and recently captured with translocated and captive animals. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.23, p.230-243, 1992.

KONTOGHIORGHES, G.J. New concepts of iron and aluminum chelation therapy with oral L1 (deferiprone) and other chelators. A review. **The Analyst**, v.120, p.845-851, 1995.

KONTOGHIORGHES, G.J., PATTICHI, K.; HADJIGAVRIEL, M.; KOLNAGOU, A. Transfusional iron overload and chelation therapy with deferoxamine and deferiprone. **Transfusion Science**, v.23, p.211-223, 2000.

LAVOIE, J.P.; TEUSCHER, E. Massive iron overload and liver fibrosis resembling hemochromatosis in a racing pony. **Equine Veterinary Journal**, v.25, p.552-554, 1993.

LOOMIS, M.J.; WRIGHT, J.F. Treatment of iron storage disease in a bali mynah. **Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians**, p.28, 1993.

LOWENSTINE, L. J. Nutritional disorders of birds. In: FOWLER, M.E. (ed.). **Zoo and Wild Animal Medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986, p.201-212.

LOWESTINE, L.J.; MUNSON, L. Iron overload in the animal kingdom. In: FOWLER, M.E.; MILLER, R.E. (Ed.). **Zoo & Wild Animal Medicine: Current Therapy 4**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999. p.260-268.

LOWESTINE, L.J.; PETRAK, M.L. Iron pigment in the liver of birds. In: MONTALI, R.J.; MIGAKI, G. (eds). **The Comparative Pathology of Zoo Animals**. Washington,

DC: Symposium of the National Zoological Park, Smithsonian Institute Press, 1980, p.127-135.

LUMEIJ, J.T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J.J.; BRUSS, M.L.; HARVEY, J.W. (eds.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997, p.857-883.

MADARAME, H.; KUMAGAI, M.; SUZUKI, J.; WATANABE, A.; KONNO, S. Pathology of excessive iron storage in the Afghan pika (*Ochotona rufescens rufescens*). **Journal of Comparative Pathology**, v.103, p.351-359, 1990.

McDONALD, D. **Iron storage disease and commercially formulated bird foods: a review of nutritional implications**. Prepared in April 2003, by Zoo Animal Nutrition, v.3. Disponível em <http://www.avianmedicine.net/avmed/research/McDonald-ISD-vit%20A-Zoo-Anim-Nut-version%202.doc>; Acesso em: 22 out. 2007.

McDONALD, S.E.; LOWESTINE, L.J. Lead toxicosis in psittacine birds. **Proceedings of the 25th International Symposium on the Diseases of Zoo Animals**, Vienna, 1983, p.183-196.

METE, A; HENDRIKS, H.G; KLAREN, P.H.M; DORRESTEIN, G.M; VAN DIJK, J.E; MARX, J.J.M. Iron metabolism in mynah birds (*Gracula religiosa*) resembles human hereditary haemochromatosis. **Avian Pathology**, v.32, n.6, p.625-632, 2003.

METE, A; JALVING, R; VAN OOST, B.A; VAN DIJK, J.E; MARX, J.J.M. Intestinal over-expression of iron transporters induces iron overload in birds in captivity. **Blood cells, Molecules, and Diseases**, v.34, p.151-156, 2005.

MONTALI, R.J.; CITINO, S.B. Pathologic findings in captive rhinoceros. In: RYDER, O.A. (ed.). **Rhinoceros Biology and Conservation**. San Diego, Zoological Society of San Diego, p.346-349, 1993.

MORRIS, P.J.; AVGERIS, S.E.; BAUMGARTNER, R.E. Hemochromatosis in a greater indian hill mynah (*Gracula religiosa*): case report and review of the literature. **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, v.3, p.87-92, 1989.

MUNSON, L.; LUIBEL, F.J.; Van KRUNINGEN, H.J. Siderophilic bodies associated with hemosiderosis and atypical mycobacterial infection in an island siamang (*Hylobates syndactylus*). **Journal of Medical Primatology**, v.20, p.265-270, 1991.

MUNSON, L.; WORLEY, M.B. Veno-occlusive disease in snow leopards (*Panthera uncia*) from zoological parks. **Veterinary Pathology**, v.28, p.37-45, 1991.

OLIVIERI, N.F.; BRITTENHARN, G.M. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. **Blood**, v.89, p.739-761, 1997.

OLSEN, G.P.; RUSSEL, K.E.; DIERENFELD, E.; PHALEN, D.N. A comparison of four regimens for treatment of iron storage disease using the European starling (*Sturnus vulgaris*) as a model. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.20, n.2, p.74-79, 2006.

ORTEGA, L.; LADERO, J.M.; CARRERAS, M.P.; ALVAREZ, T.; TAXONERA, C.; OLIVÁN, M.P.; SANZ-ESPONERA, J.; DÍAZ-RUBIO, M. A computer-assisted morphometric quantitative analysis of iron overload in liver biopsies. A comparison with histological and biochemical methods. **Pathology – Research and Practice**, v.201, p.673-677, 2005.

OSBORN, D. Seasonal changes in the fat, protein and metal content of the liver of the starling (*Sturnus vulgaris*). **Environmental Pollution**, v.19, p.145-155, 1979.

OSBORN, D.; YOUNG, W. Inter-relation between toxic and essential metals in the livers of wild starlings. In: MILLS, C.F.; BRENNER, I.; CHESTER, J.K. (eds.). **Trace Elements in Man and Animals**. Wallingford: CAB, p.864-866, 1985.

PEARSON, E.G.; HEDSTROM, O.R.; POPPENG, R.H. Hepatic cirrhosis and hemochromatosis in three horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.204, p.1053-1056, 1994.

RAHMAN, Y.E.; RAILKAR, A.M.; VENKATARARN, S. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one (DMPH or L1) in rat, rabbit and dog models. **Drugs of Today**, v.28, p.55-63, 1992.

RANDELL, M.G.; PATNAIK, A.K.; GOULD, W.J. Hepatopathy associated with excessive iron storage in mynah birds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 179, n. 11, p. 1214-1217, 1981.

REDROBE, S.P.; DREWS A.V.; PATTERSON-KANE, J.C. Successful reduction of hepatocellular haemosiderin content in toco toucans (*Ramphastos toco*) with haemochromatosis by dietary modification. In: 7th EUROPEAN ASSOCIATION OF

AVIAN VETERINARIANS CONFERENCE, 22-26 April, 2003, Tenerife, Spain.
Anais... Tenerife: European Association of Avian Veterinarians, 2003, p. 211-218.

REGH, J.E.; BUREK, J.D.; STRANDBERG, J.D.; MONTALI, R.J. Hemochromatosis in the rock hyrax. In: MONTALI, R.J.; MIGAKI, G. (eds.). **The Comparative Pathology of Zoo Animals**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, p.113-125, 1990.

RODENBUSCH, C.R. Hemossiderose e hemocromatose em aves silvestres – revisão. **Clínica Veterinária**, v.9, n.53, p 44-50, 2004.

ROELS, S.; DUCATELLE, R.; CORNELISSEN, H. Quantitative image analysis as an alternative to chemical analysis for follow-up of liver biopsies from a toucan with hemochromatosis: a technique with potential value for the follow-up of hemochromatosis in humans. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v.18, n.3, p.221-224, 1996.

RUPLEY, A.E.; OLIVEIRA, P.M.A. **Manual de Clínica Veterinária**. São Paulo: Editora Roca, 1999, p.315-316.

SCHMIDT, R.E.; REAVILL, D.R.; PHALEN, D.N. Liver, 4. chapter. In: _____ **Pathology of Pet and Aviary Birds**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Company, 2003, p.67-93.

SEIBELS, B.; LAMBERSKI, N.; GREGORY, C.R.; SLIFKA, K.; HAGERMAN, A.E. Effective use of tea to limit dietary iron available in starlings (*Sturnus vulgaris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.34, n.3, p.314-316, 2003.

SHELDON, J.H. **Haemochromatosis**. London, Oxford University Press, 1935.

SHEPPARD, C.; DIERENFELD, E. Iron storage disease in birds: speculation on etiology and implications for captive husbandry. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.16, n.3, p.192-197, 2002.

SIBLEY, C.G. **Birds of the World**. Thayer Birding Software, Ltd., 1996.

SIMON, M.; BOUREL, M.; FAUCHET, R. GENETET, B. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. **Gut**, v.17, p.332-334, 1976.

SIMON, M.; PAWLOTSKY, Y.; BOUREL, M.; FAUCHET, R.; GENETET, B. Hémochromatose idiopathique maladie associée à l'antigène tissulaire. HLA-3. **La Nouvelle Presse Médicale**, v.4, p.1432, 1975.

SMITH, J.E. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997, p.223-239.

SMITH, J.E.; CHAVEY, P.S.; MILLER, R.E. Iron metabolism in captive black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceroses. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.25, p.523-532, 1995.

SOUZA, A.F.M.; CARVALHO-FILHO, R.J.; CHEBLI, J.F. Hemocromatose hereditária. Relato de caso e revisão da literatura. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.38 n.3, 194-202, 2001.

SPALDING, M.G.; KOLLIAS, G.V.; MAYS, M.B.C.; PAGE, D.; BROWN, M.G. Hepatic encephalopathy associated with hemochromatosis in a toucan. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.189, n.9, 1986.

SPELMAN, L.H.; OSBORN, K.G.; ANDERSON, M.P. Pathogenesis of hemosiderosis in lemurs – role of dietary iron, tannin, and ascorbic acid. **Zoo Biology**, v.8, p.239-251, 1989.

SURAI, P.F. **Natural antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction**. London: Nottingham University Press, 2002.

TANNER, M.A.; GALANELLO, R.; DESSI, C.; SMITH, G.C.; WESTWOOD, M.A.; AGUS, A.; ROUGHTON, M.; ASSOMULL, R.; NAIR, S.V.; WALKER, J.M.; PENNELL, D.J. A randomized, placebo controlled, double blind trial of the effect of combined therapy with deferoxamine and deferiprone on myocardial iron in thalassaemia major using cardiovascular magnetic resonance. **Circulation**, v.115, p.1876-1884, 2007.

TAYLOR, J.J. Iron accumulation in avian species in captivity. **Dodo**, v.21, p.126-131, 1984.

TEARE, A. Physiological Data Reference Values. Apple Valley, MN: **International Species Information System (ISIS)**, CD-ROM, 2002.

THEURL, I.; FRITSCH, G.; LUDWICZEK, S.; GARIMORTH, K.; BELLMANN-WEILER, R.; WEISS, G. The macrophage: a cellular factory at the interphase between iron an immunity for the control of infections. **BioMetals**, 18: p.359-367, 2005.

TRINDER, D.; FOX, C.; VAUTIER, G.; OLYNYK, J.K. Molecular pathogenesis of iron overload. **Gut**, v.51, p.290-295, 2002.

TROUSSEAU, A. Glycosurie, diabete sucre. **Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris**, 2. ed., v.2. Paris: Bailliere, 1865, p.65.

TURNER, R. Iron storage disease (hemochromatosis) in the curassow. In: **Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians**, 1994, **Anais...AAV**, 1994, p.265-267.

Von RECKLINGHAUSEN, F.D. Uber haemochromatose. Heidelberg, Taggelblatt der (62). **Versammlung Deutscher Naturforscher and Aerzte in Heidelberg**, p.324-325, 1889.

WADSWORTH, P.F.; JONES, D.M.; PUGSLEY, S.L. Hepatic haemosiderosis in birds at the Zoological Society of London. **Avian Pathology**, v.12, p.321-330, 1983.

WAGNER, J.E.; MANNING, P.J. **The Biology of the Guinea Pig**. New York: Academic Press, 1976.

WARD, R.J.; IANCU, T.C.; HENDERSON, G.M.; KIRKWOOD, J.R.; PETERS, T.J. Hepatic iron overload in birds: analytical and morphological studies. **Avian Pathology**, v.17, p.451-464, 1988.

WEINBERG, E.D.; WEINBERG, G.A. The role of iron in infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.8, p.164-169, 1995.

WEST, G.D.; GARNER, M.M.; TALCOTT, P.A. Hemochromatosis in several species of loris with high dietary iron. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.15, n.4, p.297-301, 2001.

WHITESIDE, D.P. **Evaluation of the oral iron chelator deferiprone in the white leghorn chicken and domestic pigeon**. Guelph, Canadá, 2001. 235p. Dissertação de Doutorado em Ciências Veterinárias, The University of Guelph, Ontário, Canadá.

National Library of Canada. Disponível em:

<http://www.collectionscanada.ca/obj/s4/f2/dsk3/ftp05/NQ61990.pdf>; Acessado em: 14 out. 2007.

WHITESIDE, D.P.; BARKER, I.K.; MEHREN, K.G.; JACOBS, R.M.; CONLON, P.D. Clinical evaluation of the oral iron chelator deferiprone for the potential treatment of iron overload in bird species. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.35, n.1, p.40–49, 2004.

WILSON, R.B. Hepatic hemosiderosis and *Klebsiella* bacteremia in a green aracari (*Pteroglossus viridis*). **Avian Diseases**, v.38, n.3, p.679-681, 1994.

WONKE, B.; WRIGHT, C.; HOFFBRAND, A.V. Combined therapy with deferiprone and desferrioxamine. **British Journal of Haematology**, v.103, p.361–364, 1998.

WOOD, J.C.; OTTO-DUESSEL, M.; GONZALES, I.; AGUILAR, M.; SHIMADA, H.; NICK, H.; NELSON, M.; MOATS, R. Deferasirox and deferiprone remove cardiac iron in the iron-overloaded gerbil. **Translational Research**, v.148, n.5, p.272-280, 2006.

WORELL, A.B. Further investigations in rhamphastids concerning hemochromatosis. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS, Lake Worth, FL. **Anais...**Lake Work, FL: AAV, 1993, p.98-107.

WORELL, A.B. Phlebotomy for treatment of hemochromatosis in two sulfur-breasted toucans. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS, 1991, Chicago, IL. **Anais...**, Chicago, IL: AAV, 1991a, p.9-14.

WORELL, A.B. Ramphastids. In: TULLY, T.N.; LAWTON, M.P.C.; DORRESTEIN, G.M. **Avian Medicine**. Butterworth-Heinemann: Oxford, p.296-306, 2000.

WORELL, A.B. Serum iron levels in ramphastids. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS, 1991, Chicago, IL. **Anais...**Chicago, IL: AAV, 1991, p.120-130.

WORELL, A.B. Toucans and Mynahs. In: ALTMAN, R.B.; CLUBB, S.L.; DORRESTEIN, G.M.; QUESENBERRY, K. **Avian Medicine and Surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, p.910-917.

ZEBISCH, K.; KRAUTWALD-YUNGHANNS, M.E.; WILLUHN, J. Ultrasound-guided liver biopsy in birds. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v.45, n.3, p.241-246, 2004.

2 FISILOGIA DO FERRO E FISIOPATOLOGIA DA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

RESUMO

O ferro é um elemento essencial para todos os seres vivos, pois participa de funções celulares essenciais como transporte de oxigênio e elétrons, síntese de DNA e respiração celular. Como não existem mecanismos exclusivos de excreção do ferro, o controle metabólico do mineral ocorre principalmente pela absorção intestinal, armazenamento no sistema reticuloendotelial e pela descamação de enterócitos. A fisiologia do ferro está em permanente revisão em razão da descoberta de proteínas envolvida na homeostase do ferro e da proposição de novos modelos fisiológicos. A hemocromatose hereditária (HH) nos seres humanos é caracterizada por absorção excessiva de ferro, saturação da transferrina e depósito do ferro em órgãos vitais, como fígado, pâncreas e coração, causando prejuízo das funções dos órgãos. A forma mais comum de HH é decorrente de mutações no gene HFE, resultando em doença recessiva autossômica que afeta predominantemente homens idosos. Outras formas de HH incluem mutações nos genes da hemojuvelina (HJV), da hepcidina (HAMP), e receptores de transferrina-2 (TfR2). Modelos fisiopatológicos distintos são propostos para explicar os diferentes fenótipos da HH. A hepcidina é apontada como um regulador sistêmico do ferro, e as diferentes formas de hemocromatose hereditária seriam decorrentes da deficiência de hepcidina, que atua inibindo o afluxo celular de ferro por se ligar à ferroportina, que sofre degradação lisossômica. Propõe-se que a proteína da hemocromatose (HFE), a hemojuvelina (HJV), e os receptores da transferrina-2 (TfR2) sejam moduladores positivos na expressão do RNAm da hepcidina no fígado, e mutações nos genes que expressam essas proteínas alterem a fisiologia do ferro, ocorrendo a HH. Animais de espécies suscetíveis à hemocromatose nutricional secundária parecem apresentar mecanismos fisiopatológicos que se assemelham à HH nos seres humanos.

PALAVRAS-CHAVE: Ferro, fisiopatologia hemocromatose, hepcidina, ferroportina.

IRON PHYSIOLOGY AND HEREDITARY HEMOCHROMATOSIS PATHOPHYSIOLOGY

ABSTRACT

Iron is essential to all living organisms as it takes part in vital cell function such as transport of electrons and oxygen, DNA synthesis, and cell respiration. As there is no effective mechanisms evolved to control iron excretion, iron homeostasis is regulated mainly by intestinal absorption, reticuloendothelial system storage and gastrointestinal epithelial cell losses. With the discovery of proteins involved in iron homeostasis, iron physiology has been in permanent revision, and new models to iron physiology have been proposed. Hereditary hemochromatosis (HC) in man is characterized by excessive intestinal iron absorption, saturation of transferrin, and deposition of iron in vital organs, mainly in the liver, pancreas and heart, resulting in malfunction of these organs. The most common form of HC results of mutations in HFE gene, resulting in autosomal recessive disorder that predominantly affects older men. Other forms of HC include mutations in hemojuvelin gene HJV, hepcidin gene HAMP, and transferrin receptor-2 (TfR2) gene. Distinct pathophysiologic models are proposed to explain different phenotypes of HC in man. Hepcidin is pointed out as the main systemic regulator of iron, and the different forms of HC results of hepcidin deficiency. Hepcidin inhibit cellular efflux of iron by binding to, and inducing the degradation of ferroportin. It is proposed that HFE protein, hemojuvelin (HJV), and transferrin iron receptors-2 (TfR2), up-regulate hepcidin mRNA expression in the liver and mutations in the respective genes that express these proteins alter iron physiology and induces Hereditary Hemochromatosis. Species of animals prone to nutritional hemochromatosis may have evolved pathophysiologic mechanism that resembles human HC.

KEY-WORDS: Iron, hemochromatosis pathophysiology, hepcidin, ferroportin.

2.1 INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento químico abundante na natureza e necessário para que se processem importantes reações bioquímicas nos seres vivos, principalmente em condições de aerobiose. A alta capacidade do ferro em transferir elétrons e oxigênio torna-o essencial para diversas funções celulares, como síntese de DNA, transporte de oxigênio e elétrons e respiração celular (PIETRANGELO, 2003). Nas hemácias, o ferro que compõe a porção heme da hemoglobina possibilita sítios de ligação ao oxigênio, permitindo seu transporte interno e distribuição aos tecidos. O ferro confere a capacidade de oxidação e redução aos citocromos na cadeia respiratória e também a diversas enzimas (ANDREWS, 2000).

Contudo, o ferro também é catalisador de reações químicas que geram radicais livres potencialmente causadores de estresse oxidativo e danos celulares (PIETRANGELO, 2002). Esses elementos químicos altamente reativos e que causam danos celulares são genericamente denominados espécies ativas de oxigênio (EOS ou ROS: *reactive oxygen species*) e compreendem superóxidos, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e oxigênio simples. Os níveis celulares de ferro são regulados por mecanismos moleculares complexos que mantêm a concentração de ferro intracelular adequada às necessidades metabólicas e abaixo dos níveis tóxicos (PIETRANGELO, 2002). Para manter a homeostase, mudanças séricas e teciduais nos níveis de ferro devem ser imediatamente reconhecidas de modo a ajustar a absorção intestinal e armazenamento do mineral (BARRIOS et al., 2005).

Os organismos desenvolveram mecanismos moleculares para a absorção, transporte, depósito e reaproveitamento do ferro, que quando alterados, podem causar doenças potencialmente fatais como anemia e hemocromatose.

Doenças decorrentes da sobrecarga de ferro estão associadas a alterações hereditárias ou secundárias do metabolismo do ferro. A definição dada para hemocromatose pelo grupo de especialistas da EASL (*European Association for the Study of the Liver*) é: doenças hereditárias decorrentes de defeitos no metabolismo do ferro que levam à sobrecarga progressiva de células parenquimatosas no fígado, pâncreas e coração (PIETRANGELO, 2000). Na Medicina Veterinária, o termo

hemocromatose é utilizado para descrever doenças que causam o acúmulo excessivo de ferro em vários órgãos, principalmente no fígado, com lesões celulares significativas e decorrente dano às suas funções, independente da etiologia.

As doenças decorrentes da sobrecarga de ferro nos seres humanos podem ser primárias ou secundárias. Como causas primárias estão mutações genéticas que alteram a homeostase do ferro e causam a hemocromatose hereditária ou idiopática (Quadro 1). Como causas secundárias (ou adquiridas) estão os depósitos de ferro decorrentes de outros processos, como sobrecarga dietética de ferro, doenças hepáticas crônicas e outras que causam alterações patológicas no parênquima hepático e em vários órgãos (ADAMS et al., 2000; LIBERATI et al., 2000; PIETRANGELO, 2003; PIETRANGELO, 2006; OMIM, 2007).

A Hemocromatose Hereditária (HH) é uma das doenças de origem genética mais comuns, com prevalência em populações caucasianas em torno de cinco para 1000 habitantes (FEDER et al., 1996; QUERA et al., 2002; SOUZA et al., 2001). A síndrome é resultante de uma falha genética no mecanismo fisiológico de reconhecimento dos níveis de ferro no organismo, não ocorrendo redução ou interrupção da entrada de ferro no organismo, mesmo quando há sobrecarga de ferro e a absorção do mineral não seria mais necessária. Curiosamente, diferente da maioria das doenças hereditárias autossômicas recessivas, que tem frequência igualmente distribuída entre os sexos, a HH é mais comum em homens na proporção de 4 a 10:1 (SOUZA et. al, 2001). A mulher pode apresentar sinais em idade mais avançada e formas mais brandas da doença, provavelmente em razão da perda mensal de ferro em hemorragias nos períodos de menstruação, e também durante períodos de demanda aumentada como na gestação (EASL, 2000; NUSSBAUM et. al, 2004).

O progressivo acúmulo de ferro no fígado, pâncreas, coração, glândulas endócrinas (hipófise) e pele causa dano celular e fibrose. O ferro, pela sua capacidade de transferir elétrons, tem a capacidade de gerar radicais livres, que provocam uma lipoperoxidação nas membranas, liberação de enzimas hidrolíticas, degradação de DNA, alteração da atividade mitocondrial e morte celular. A produção de colágeno pode ocorrer em decorrência da sobrecarga de ferro em hepatócitos e células de Kupffer, que liberam substâncias profibrogênicas que ativam as células

estreladas hepáticas (células intersticiais ou células armazenadoras de gordura) a produzir colágeno e outras matrizes protéicas, ocorrendo fibrose (QUERA et al., 2002; TRINDER et al., 2002). Carcinoma hepatocelular pode resultar de alterações nos cromossomos ou proliferação e diferenciação de células-tronco hepáticas denominadas células ovais (TRINDER et al., 2002).

Na HH o genótipo indica apenas o risco do indivíduo à hemocromatose. Para que seja caracterizada a doença é preciso que ocorra a sobrecarga de ferro e decorrentes alterações patológicas. As alterações orgânicas e sintomas nos seres humanos incluem fraqueza (60% dos casos), artralgia e artrite (30-40%), hepatomegalia e cirrose (60%), carcinoma hepático (5%), diabetes mellitus (10-30%), disfunção sexual (10-40%), e sinais cardíacos como arritmia (20-29%) e insuficiência cardíaca (15-35%), e pigmentação de pele (ADAMS et al., 2000).

Como há semelhança na fisiopatologia da hemocromatose nos seres humanos e nos animais, e porque o conhecimento da doença no Homem está mais avançado, uma revisão da Hemocromatose Hereditária faz-se necessária para melhor compreensão da hemocromatose nas aves silvestres (METE et al., 2003; METE et al., 2005). A revisão do metabolismo do ferro permite atualizar os conhecimentos recentes, principalmente após a descoberta de novas moléculas que levaram à idealização de novos modelos fisiológicos e fisiopatológicos para as doenças relativas ao metabolismo do ferro.

QUADRO 1 - TIPOS E CARACTERÍSTICAS DA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA (HH) NOS SERES HUMANOS

Tipo/ características	HFE	HH Juvenil		HH TfR2	Ferroportina
Classificação OMIM	Tipo 1	Tipo 2, subtipo A	Tipo 2, subtipo B	Tipo 3	Tipo 4
Gene e cromossomo	HFE, 6p21.3	HJV, 1q21	HAMP, 19q13.1	TfR2, 7q22	SLC40A1, 2q32
Proteína	HFE	Hemojuvelina	Hepcidina	TfR2	Ferroportina
Funções	Interação com TfR1; Modulador da hepcidina.	Modulador da hepcidina.	Regulação negativa do fluxo de ferro nos enterócitos, macrófagos e células placentárias.	Importação de ferro ligado à transferrina pelos hepatócitos; Modulador da hepcidina.	Exportação de ferro nos enterócitos, macrófagos, células placentárias e hepatócitos.
Herança genética	Autossômico recessivo	Autossômico recessivo	Autossômico recessivo	Autossômico recessivo	Autossômico dominante

HFE – Proteína da Hemocromatose

TfR2 – Receptores da Transferrina-2

HJV – Hemojuvelina

OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man* (Herança Mendeliana no Homem Online)

Adaptado de: PIETRANGELO, A. Hereditary hemochromatosis – A new look at an old disease. The New England Journal of Medicine, v.350, p.2383-2397, 2004.

2.2 FISIOLÓGIA DO FERRO

O ferro é essencial a todos os seres vivos, exceto *Lactobacillus* (SMITH, 1997), por ser componente de importantes ferrometaloproteínas não enzimáticas (hemoglobina, ferridoxina e ferritina) e de ferrometaloproteínas de atividade enzimática, por exemplo: RNA redutase, citocromos, citocromoxidase, peroxidase, catalase, xantinaoxidase (BACILA, 2003). O ferro está presente em cromatóforos - pigmentos vermelhos e pretos das penas das aves (WHITESIDE, 2001). Por existir tanto como íon reduzido (Fe^{2+}) quanto oxidado (Fe^{3+}), o ferro participa de reações de oxidação e redução, e da distribuição e armazenamento de oxigênio na forma de

hemoglobina e mioglobina. Os citocromos *a*, *b* e *c* estão localizados nas mitocôndrias e são importantes na fosforilação oxidativa (SMITH, 1997; PIETRANGELO, 2003). O citocromo P450 está no retículo endoplasmático e atua na degradação oxidativa de compostos endógenos e fármacos (SMITH, 1997).

Contudo, o ferro livre pode catalisar radicais livres do oxigênio molecular e íons hidrogênio, que são tóxicos para o organismo (SMITH, 1997; PIETRANGELO, 2002). Para evitar os efeitos tóxicos do ferro, os seres vivos desenvolveram proteínas especializadas na absorção, transporte, utilização e depósito do ferro (BROCK et al., 1994; SMITH, 1997). Como a absorção de ferro da dieta é limitada em condições normais, normalmente não ocorre intoxicação aguda (CORK, 2000).

Mecanismos fisiológicos de controle do ferro no organismo asseguram que quantidades suficientes do mineral estejam presentes. Como não há via de excreção para quantidades excessivas de ferro, o controle fisiológico na absorção deve ser preciso (FAIRBANKS, 1994; SMITH et al., 1997; LOWESTINE e MUNSON, 1999, WHITESIDE, 2001).

O ferro inorgânico ingerido é solubilizado no estômago glandular dos mamíferos e no proventrículo e ventrículo das aves pela ação do ácido clorídrico, formando uma solução rica em prótons no duodeno (ANDREWS, 1999; FAIRBANKS, 1994; WHITESIDE, 2001).

A absorção do ferro ocorre em todo o intestino, mas nos mamíferos é mais eficiente no duodeno e nas aves no duodeno e jejuno (ANDREWS, 1999; WHITESIDE, 2001). A absorção intestinal de ferro é regulada por diversos fatores sistêmicos, incluindo quantidade de ferro recentemente ingerida, reserva de ferro no organismo, atividade hematopoiética e hipóxia (WHITESIDE, 2001; TRINDER et al., 2002). O ferro disponível na dieta pode estar na forma heme ou iônica, sendo seus mecanismos de absorção diferentes. A heme é liberada da mioglobina e hemoglobina ingeridas pela digestão proteolítica por enzimas pancreáticas, sendo sua absorção ainda pouco conhecida. Sabe-se que uma proteína específica faz a passagem do ferro heme pela membrana apical do enterócito, sendo em seguida a heme degradada no citoplasma pela hemoxigenase e o ferro inorgânico liberado da estrutura tetrapirrólica (PÉREZ et al., 2005; TRINDER et al., 2002).

A maioria do ferro não-heme existe primariamente no ambiente na forma férrica (Fe^{3+}), que é praticamente insolúvel em água em pH maior que 3, mas no

estômago forma complexos solúveis do microelemento, que são absorvidos no duodeno através de uma proteína de membrana beta-3-integrina, sendo em seguida transferidos a uma proteína chaperona (auxiliar), a mobilferrina. No citoplasma do enterócito, o ferro absorvido é convertido ao estado ferroso (Fe^{2+}) por um complexo protéico citoplasmático chamado paraferitina (PÉREZ et al., 2005).

Outra via de absorção do ferro na membrana apical do enterócito é pela redução do ferro da forma férrica (Fe^{3+}) para ferrosa (Fe^{2+}) pela enzima ferroredutase citocromo-b duodenal (Dcytb), sendo o Fe^{2+} transportado através da membrana pela proteína DMT-1 (transportadora de metal divalente-1), também envolvida no transporte de outros íons divalentes como cobalto, cobre, zinco, cádmio, chumbo e zinco (ANDREWS, 2000; HENTZE et al., 2004; PÉREZ et al., 2005).

No interior do enterócito, o ferro tem três caminhos a seguir: 1) É utilizado nas funções celulares específicas; 2) É armazenado no citoplasma associado à ferritina, podendo ser posteriormente excretado nas fezes com a descamação de enterócitos senis; 3) É transferido para o plasma através da membrana basolateral do enterócito por intermédio da proteína ferroportina, também conhecida como Ireg1 (reguladora do ferro-1). Na membrana basolateral do enterócito o ferro é oxidado por ação de uma enzima ferroxidase, a hefastina, ligando-se naturalmente à transferrina (ANDREWS, 2000; TRINDER et al., 2002; HENTZE et al., 2004; BARRIOS et al., 2005; PÉREZ et al., 2005).

A transferrina é uma glicoproteína que se liga fortemente, mas de forma reversível, a dois átomos de ferro (Fe^{3+}), transportando-os no plasma e no líquido extracelular. Embora o ferro ligado à transferrina represente menos de 0,1% do ferro total disponível no organismo, é a reserva mais importante por sua elevada taxa de utilização (ANDREWS, 2000). Quando os dois sítios da transferrina estão ligados ao ferro, a transferrina diférrica é dita saturada (FAIRBANKS, 1994; WHITESIDE, 2001). No ser humano, em condições normais, em torno de 40% da proteína transferrina está ligada ao ferro, sendo o restante conhecido como capacidade latente de ligação do ferro (RODENBUSCH et al., 2004). Em mamíferos, de uma forma geral, uma terça parte da transferrina plasmática está normalmente saturada, havendo tanto transferrina monoférrica como diférrica (FAIRBANKS, 1994; WHITESIDE, 2001). A transferrina liga-se também ao ferro disponibilizado por macrófagos, após

degradação da hemoglobina no interior destas células (FAIRBANKS, 1994; WHITESIDE, 2001). O ferro é então distribuído para o organismo. Em torno de 80% do elemento é levado à medula óssea para utilização pelos precursores de eritrócitos e o restante é distribuído a outras células para a síntese de hemoglobina, citocromos, peroxidase e outras enzimas dependentes de ferro (FAIRBANKS, 1994; WHITESIDE, 2001). Os receptores limpadores de hemoglobina CD163 nos macrófagos e monócitos atuam na remoção de hemoglobina da circulação (HENTZE et al., 2004).

Células que necessitam de ferro expressam em sua superfície receptores de transferrina (TfR). Transferrina carregada de ferro liga-se a receptores de transferrina em fossas recobertas com uma proteína denominada clatrina. Esse complexo é então internalizado por endocitose formando uma vesícula ou endossomo (FAIRBANKS, 1994; ANDREWS, 1999; WHITESIDE, 2001; PÉREZ et al., 2005). No endossomo, uma bomba de próton existente na membrana endossômica envia prótons do citosol para o interior do endossomo, reduzindo o pH para 5,5, e conseqüentemente, liberando o ferro ligado à transferrina. A DMT-1 presente no citosol transporta o ferro através da membrana endossômica para o citosol, enquanto que o complexo apotransferrina (transferrina sem ferro) com receptor de transferrina é transportado para a superfície celular, onde é reciclado para nova utilização. O ferro no citoplasma pode ser utilizado em proteínas celulares, pode ser armazenado na forma de ferritina ou hemossiderina ou pode servir como regulador dos níveis de ferro (FAIRBANKS, 1994; ANDREWS, 1999; PÉREZ et al., 2005).

A regulação da síntese de algumas proteínas envolvidas na homeostase do ferro depende da interação entre IRP (proteínas ferro-responsivo) e IRE (elementos ferro-responsivo) do RNA mensageiro dessas mesmas proteínas. Os IRPs são proteínas citosólicas que se ligam aos IREs localizados nas regiões não traduzidas 5' e 3' UTR do RNAm. A expressão dessas proteínas depende da localização das ligações IRP-IRE (PHILLIPS et al., 1996; WESSLING-RESNICK, 2006). A IRE 5' define o controle translacional, de modo que a síntese protéica é reduzida quando há ligação de IRP nessa extremidade. Na extremidade IRE 3' a ligação IRE-IRP estabiliza o RNAm, portanto, aumenta a síntese protéica quando ocorre esta ligação. Proteínas reguladas por esse mecanismo incluem a ferritina, receptores de

transferrina (TfR1), ferroportina e DMT-1 (WESSLING-RESNICK, 2006). O RNAm, tanto da ferritina como da ferroportina, possui um IRE na extremidade 5' UTR; o RNAm da DMT-1 tem um IRE na extremidade 3' UTR, e o do TfR1 tem cinco IRE na extremidade 3' UTR. Os níveis de ferro intracelular é que regulam a ativação ou inativação das IRPs e sua conseqüente ligação com os IREs, influenciando a expressão dos respectivos RNAm e produção protéica (EISENSTEIN e BLEMINGS, 1998; HENTZE et al., 2004; BARRIOS et al., 2005).

A maior parte do ferro do organismo, em condições normais, é utilizada por precursores eritróides para a produção de heme. Eritrócitos velhos são fagocitados, principalmente no fígado e baço (FAIRBANKS, 1999).

O ferro é armazenado em tecidos como ferritina - fração protéica difusa, solúvel e instável - ou como hemossiderina: agregados insolúveis (SMITH, 1997). Micelas de ferritina são formadas na medula óssea, fígado, rins, baço, mucosa intestinal e em células do sistema mononuclear-fagocitário. Grânulos de hemossiderina são encontrados principalmente no fígado, baço e células mononucleares-fagocitárias (FRANCO, 1997). O fígado e o baço são os órgãos que normalmente têm a maior concentração de ferro, seguidos por rim, coração, músculo esquelético e cérebro (UNDERWOOD, 1977). Quando as reservas de ferro estão baixas, mais mineral é depositado como ferritina do que como hemossiderina. À medida que a reserva de ferro aumenta, a proporção de hemossiderina se eleva em relação à ferritina (SMITH, 1997; BACILA, 2003). Tanto o ferro armazenado na forma de ferritina como hemossiderina estão disponíveis para utilização pelo organismo (SMITH, 1997). A hemossiderina pode ser formada a partir de ferritina solúvel no citosol por ação lisossômica (SMITH, 1997).

A ferritina contém em torno de 23% (em peso) de ferro e é constituída de uma proteína, a apoferritina, e de um hidroxifosfato férrico. A hemossiderina contém 37% em peso seco de ferro e é formada de grânulos com ferro coloidal (BACILA, 2003). A ferritina está livre no citoplasma celular e o ferro a ela ligada não é facilmente visível em estudos histológicos de rotina corados com Hematoxilina e Eosina ou mesmo com colorações específicas.

A hemossiderina, como é insolúvel em água, permanece em tecidos processados para exame histológico, sendo o ferro a ela ligada facilmente observado na microscopia óptica como grânulos marrom-dourados, quando corados

por Hematoxilina e Eosina (HE), ou como grânulos azul-esverdeados, quando corados por Azul da Prússia (KELLY, 1993; SMITH, 1997). Corantes específicos são necessários para diferenciar o ferro depositado em hemossiderina de outros pigmentos existentes no fígado, como lipofucsina e bile (LOWESTINE e MUNSON, 1999).

O corante Azul da Prússia (AP) é utilizado para visualizar ferro celular livre, ferro ligado à hemossiderina e também à ferritina. A reação se processa na interação de íons ferrocianeto do corante com íons férricos no interior da célula, resultando em um produto de cor azul-esverdeada chamado ferrocianeto férrico.

As primeiras proteínas conhecidas na fisiologia do ferro foram a ferritina (Ft), transferrina (Tf) e receptor de transferrina (TfR). Atualmente outras proteínas são conhecidas e a fisiologia do ferro está em permanente revisão (BARRIOS et al., 2005).

Proteínas que participam da absorção, transporte, armazenamento, reciclagem e controle metabólico do ferro no organismo são descritas a seguir.

2.2.1 Citocromo-b duodenal ou Dcytb (*Duodenal Cytochrome b*)

Proteína heme ligada à membrana celular apical dos enterócitos nas vilosidades intestinais, que catalisa a redução do ferro de seu estado férrico para ferroso (ferroredutase), tornando possível sua absorção através da proteína transportadora de íon metal divalente-1 ou DMT-1 (TRINDER et al., 2002; HENTZE et al., 2004; PIETRANGELO, 2006).

2.2.2 Proteína transportadora de íon metal divalente-1 ou DMT-1 (*Divalent metal transporter*)

Proteína antigamente conhecida pelas siglas Nramp2 (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein*) ou DCT1 (*Divalent Cation Transporter*), que permite a entrada de ferro da luz intestinal para os enterócitos através da membrana celular apical. Também atua no citoplasma dos eritrócitos e suas células precursoras liberando o ferro retido em vesículas endossomais para o citosol. Não é um

transportador específico de ferro, pois também permite a passagem de metais pesados como manganês, cobalto, cobre, zinco, cádmio e chumbo. A expressão dessa proteína é regulada pelas reservas corporais de ferro, mas também responde ao nível de ferro dietético (BARRIOS et al., 2005). A DMT-1 é altamente expressa na membrana celular dos macrófagos e também em seu interior, onde participa da transferência de ferro do endossomo para o citoplasma (THEURL et al., 2002).

2.2.3 Ferroportina ou proteína reguladora de ferro-1 ou Ireg1 (*Iron Regulator 1*)

Proteína isolada e caracterizada no ano 2000 que tem a função de transportar o ferro através das membranas dos enterócitos (membrana basolateral), hepatócitos, macrófagos e outras células. É considerada a única exportadora celular de ferro (GANZ, 2006). A ferroportina é expressa nos tecidos envolvidos na homeostase do ferro e que têm demanda pelo mineral, incluindo sistema mononuclear-fagocitário, fígado, baço, placenta e músculos. É essencial para a absorção e liberação das reservas corporais de ferro (fígado e células mononucleares), e também para a reciclagem do ferro heme pelos macrófagos (BARRIOS et al., 2005; THEURL et al., 2002).

2.2.4 Hefastina e cerulosplamina

Descoberta em 1999, a hefastina é uma proteína rica em cobre, sendo ponto de união entre o metabolismo do ferro e cobre. Atua como ferroxidase necessária para a passagem do ferro através da membrana basolateral do citoplasma do enterócito para a circulação, ligando o mineral à apotransferrina como ferro trivalente (Fe^3). É expressa nos enterócitos em sua membrana basolateral e em vesículas citoplasmáticas (BARRIOS et al., 2005). A cerulosplamina atua como ferroxidase sérica de maneira semelhante à hefastina, mas na membrana celular dos macrófagos (THEURL et al., 2002).

2.2.5 Transferrina (Tf)

Glicoproteína que se liga fortemente, mas de forma reversível, a dois átomos de ferro, transportando-o no plasma e no líquido extracelular (ANDREWS, 2000).

2.2.6 Receptor da transferrina-1 ou TfR1 (*Transferrin Receptor 1*)

Proteína que funciona como receptor de transferrina nas membranas celulares, e quando ligada à HFE (Proteína da Hemocromatose) e à transferrina férrica formam complexos (HFE-TfR1-Tf-Fe³⁺) que são internalizados nos enterócitos das criptas, formando endossomos. O TfR1 está envolvido também na importação de ferro pelas células precursoras dos eritrócitos e macrófagos.

2.2.7 Receptor da transferrina-2 ou TfR2 (*Transferrin Receptor 2*)

Embora o TfR2 seja também um facilitador da passagem de ferro transportado pela transferrina para o interior das células, suas propriedades diferem da sua homóloga, a TfR1. Diferenças importantes são que o TfR2 não se liga à proteína HFE e seu padrão de expressão é elevado no fígado e nas células mononucleares do sangue periférico (PIETRANGELO, 2006; PIETRANGELO, 2002; BARRIOS et al., 2005). Outra diferença em relação ao TfR é que o TfR2 não possui IRE em sua região 3' UTR do RNAm (BARRIOS et al., 2005) Embora a função exata do TfR2 não esteja bem esclarecida, postula-se que atue como um “sensor” da saturação de transferrina plasmática e com isso, contribua para a modulação positiva da síntese de hepcidina pelo fígado (PIETRANGELO, 2006; PIETRANGELO, 2002; BARRIOS et al., 2005).

2.2.8 Proteína da hemocromatose ou HFE (*Human Hemochromatosis Protein*)

Proteína identificada em 1996, expressa pelo gene de mesmo nome, a HFE é encontrada principalmente na membrana basolateral dos enterócitos das criptas intestinais, hepatócitos, glândulas endócrinas, coração e macrófagos (PIETRANGELO, 2004; BARRIOS et al., 2005). Tem a função de interagir de forma pH dependente com TfR1 (receptores de transferrina-1) na membrana celular,

favorecendo a incorporação celular de ferro ligado à transferrina. No modelo sistêmico para a fisiologia do ferro postula-se que a HFE seja um modulador positivo da expressão da hepcidina, e por isso, é considerada um “sensor” das reservas corporais de ferro. É no gene que expressa a HFE que ocorre a mutação C282Y, a mais comum das mutações que causam a hemocromatose hereditária no ser humano.

2.2.9 Ferritina e hemossiderina

A ferritina é uma macromolécula que armazena em seu centro até quatro mil átomos de ferro na forma férrica e libera-os para o citosol e meio extracelular de forma controlada como ferro ferroso (Fe^{2+}). Trata-se da proteína de reserva mais importante presente em todas as células, principalmente em precursores eritróides, hepatócitos e macrófagos. A ferritina pode ser encontrada sob a forma de depósitos intracitoplasmáticos, inclusões lisossômicas ou como aglomerados de hemossiderina visíveis ao microscópio (RESIO et al., 2003). O ferro que excede a quantidade de apoferritina do organismo é depositado como hemossiderina, um componente tecidual contendo grânulos de ferro coloidal (BACILA, 2003).

2.2.10 Hepcidina, acrônimo de *Hepatic Bactericidal Protein*

Foi descrita pela primeira vez como LEAP-1 (*Liver-expressed Antimicrobial Peptide 1*). A hepcidina é um pequeno peptídeo de 20 a 25 aminoácidos, rico em cisteína, com propriedade antimicrobiana. É produzida pelos hepatócitos e considerada um regulador negativo da absorção de ferro no intestino delgado e na exportação de ferro pelos macrófagos. A hepcidina foi descoberta em 2000 por dois grupos independentes de pesquisadores: um isolou-a de urina humana (PARK et al., 2001) e o outro a encontrou no plasma humano ultrafiltrado (KRAUSE et al., 2000). Os estudos indicam que esta é a molécula sinalizadora que promove a diminuição da absorção de ferro no intestino delgado e que aumenta a retenção de ferro de reserva nos macrófagos em resposta ao aumento das reservas corporais de ferro ou em razão de reação inflamatória. Sua deficiência ou ausência tem papel chave na

patogênese da hemocromatose e seu excesso provoca anemia (BARRIOS et al., 2005; BARRIOS e DELGADO, 2004; RUEDA e ALVAREZ, 2003). O aumento da hepcidina induzida por interleucina-6 e outras citocinas inflamatórias em infecções crônicas, doenças inflamatórias não infecciosas generalizadas, e em alguns tipos de cânceres é tido como responsável pela anemia decorrente de inflamação (GANZ, 2006).

2.2.11 Hemojuvelina (HJV)

Descrita em 2004, é a mais recente proteína descoberta na fisiologia do ferro. Sua função não está ainda bem esclarecida, mas se acredita que seja um modulador positivo da expressão da hepcidina. A hemojuvelina é expressa no fígado, coração e músculo esquelético. Uma mutação no gene HJV no cromossomo 1q21 está relacionada à hemocromatose juvenil, uma doença grave na qual os níveis de hepcidina estão diminuídos. (BARRIOS et al., 2005; NIEDERKOFER et al., 2005; PIETRANGELO, 2004).

2.2.12 Proteínas reguladoras de ferro 1 e 2 ou IRP1 e IRP2 (*Iron Regulatory Protein* 1, 2)

O controle genético da biossíntese das proteínas envolvidas no metabolismo do ferro, como ferritina, TfR1, ferroportina e DMT-1 é feito pelas proteínas reguladoras de ferro 1 e 2 (IRP1 e IRP2), que são proteínas citosólicas que se ligam a elementos ferro-responsivo (IRE – *Iron Responsive Elements*) dos RNAm das respectivas proteínas (PHILLIPS et al., 1996; SMITH, 1997).

As IRE são seqüências de nucleotídeos filogeneticamente conservadas constituídas por 28 bases e que formam uma estrutura secundária em forma de forquilha, conformação que lhe permite interagir com as IRP (PÉREZ. et al., 2005). As IRE estão localizadas nos extremos 5' ou 3' de regiões UTR (*untranslated region* – regiões não traduzidas) dos RNAm de proteínas envolvidas metabolismo do ferro (BARRIOS et al., 2005).

As IRP podem bloquear a tradução quando interagem com os IRE na extremidade 5' UTR, pois é nessa extremidade que ocorre a união do RNAm ao ribossomo e se inicia a tradução; ou podem estabilizar o RNAm, quando a ligação IRP-IRE ocorre na extremidade 3' UTR (final da tradução), evitando a degradação do RNAm pela ação de endorribonucleases (EISENSTEIN e BLEMINES, 1998; PÉREZ, et al., 2005).

2.3 MODELOS FISIOLÓGICOS

2.3.1 Modelo programação das criptas

Neste modelo, a importação de ferro plasmático pelas células das criptas intestinais é regulada pelo nível de saturação da transferrina e sua interação com TfR1 e HFE na membrana basolateral dos enterócitos. Desta forma, o nível de ferro lábil citoplasmático nos enterócitos das criptas “programa” a capacidade de absorção de ferro nos enterócitos das vilosidades (diferenciados a partir dos enterócitos das criptas), possibilitando maior ou menor expressão dos RNAm e produção das proteínas transportadoras de ferro DMT1 e ferroportina (HENTZE et al., 2004; PIETRANGELO, 2004; PÉREZ et al., 2005).

2.3.2 Modelo sistêmico

A descoberta da hepcidina revelou a importância do fígado na regulação homeostática do ferro, tanto em sua absorção quanto na exportação celular (PIETRANGELO, 2006). Estudos recentes indicam que a hepcidina controla o fluxo sistêmico de ferro, ligando-se à ferroportina e induzindo sua internalização e degradação lisossômica (NEMETH et. al., 2004; KNUTSON et al., 2005; GANZ, 2006). No enterócito, a consequência dessa redução da ferroportina na parede celular é uma menor passagem de ferro absorvido (e presente no interior dos enterócitos) pela membrana basolateral. Os enterócitos senis com depósito de ferro são descamados e o mineral deixa de ingressar na corrente circulatória. Da mesma maneira, a menor disponibilidade de ferroportina na membrana celular dos

hepatócitos e macrófagos diminui a exportação de ferro para o plasma (BARRIOS e DELGADO, 2004; BARRIOS et al., 2005). O hepatócito retira o ferro circulante na forma livre ou unida à transferrina pela mediação dos TfR1 e TfR2 (PIETRANGELO, 2006).

Nesse modelo, os TfR2, HFE e HJV servem como sensores da transferrina férrica e moduladores da expressão da hepcidina. Com o aumento da saturação de transferrina, a hepcidina é secretada e liberada na corrente circulatória para interagir com a ferroportina dos enterócitos, macrófagos e hepatócitos, reduzindo sua disponibilidade e diminuindo a transferência tanto de ferro dos enterócitos (absorvidos na digestão) quanto de ferro dos hepatócitos e macrófagos (armazenados) para o compartimento circulatório (BARRIOS et al., 2005).

Estudos recentes indicam que a hemojuvelina (HJV) funciona como um co-receptor para a sinalização da proteína óssea morfogênica (BMP, *Bone Morphogenic Protein*) e que a sinalização da BMP favorece a expressão da hepcidina no fígado (BABBIT et al., 2007).

É possível que o nível de ferro sérico e a taxa de saturação da transferrina sejam os sinais para o retrocontrole da hepcidina, mas como isso acontece não é ainda conhecido (PIETRANGELO, 2006).

A interação direta da hepcidina com a ferroportina não deve ser a única via que regula a densidade de ferroportina na membrana celular. Há evidências de que o nível do RNAm da ferroportina é regulado pelo próprio ferro (GANZ, 2006).

2.3.3 Modelo duas vias

O modelo de homeostase duas vias (*two-step model*) consiste na proposição de que o transporte de ferro através da superfície apical do epitélio intestinal é regulado localmente nos próprios enterócitos pelo nível interno de ferro, enquanto que o controle da passagem de ferro pela membrana basolateral é feito por reguladores sistêmicos, como a hepcidina (WESSLING-RESNICK, 2006). Corroboram este modelo o fato de que a expressão das proteínas DMT-1 e Dcytb (de superfície apical) sofrem influência da concentração de ferro na luz intestinal como indica pesquisa que demonstrou a supressão de DMT-1 e Dcytb após a administração

intragástrica de uma dose alta de ferro. Já os RNAm da ferroportina e hefastina, importadoras de ferro através da membrana basolateral, não sofreram o efeito dessa superdose oral de ferro (FRAZER et al., 2003).

2.4 FISIOPATOLOGIA DA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

Um modelo fisiopatológico unificado para a HH é proposto, no qual as proteínas HFE, TfR2 e HJV atuam de forma independente, mas complementar, na modulação da síntese hepática de hepcidina, peptídeo-chave que faz a regulação negativa da taxa de absorção de ferro nos enterócitos e na liberação do ferro depositado nos macrófagos para a corrente circulatória. Alterações genéticas nos genes de uma das três proteínas reguladoras da hepcidina poderiam causar redução na sua síntese. Contudo, a atividade da hepcidina residual, produzida pelo outros dois fatores intactos, manteria parcialmente sua atividade fisiológica. Isso explicaria os diferentes fenótipos na HH e suas manifestações clínicas (PIETRANGELO, 2006).

A contribuição dos três genes no processo de modulação da hepcidina parece ocorrer de forma diferente, sendo uma forma relativamente grave de HH a relacionada a mutações na HJV (HH tipo 2, subtipo A), considerada um dos importantes moduladores e que resulta em doença chamada Hemocromatose Hereditária Juvenil. A HH decorrente de mutações no gene HFE (HH tipo 1) ou no TfR2 (HH tipo 3) resulta em um grande fluxo de ferro para a circulação e conseqüente sobrecarga em órgãos específicos, mas a hepcidina residual modulada pela segunda proteína reguladora e pela HVJ sustentaria a atividade da hepcidina. Portanto, parece não haver nas HH tipo 1 e tipo 3 uma ausência completa de hepcidina e a doença manifestada é considerada mais branda. Mutações genéticas com perda simultânea da HFE e TfR2 resultariam em uma sobrecarga de ferro considerada grave. Finalmente, a ausência completa de hepcidina em decorrência de mutação no gene HAMP (HH tipo 2, subtipo B) causaria um aporte descontrolado de ferro na circulação e um forma grave da doença (PIETRANGELO, 2006; PIETRANGELO et al., 2005).

2.5 REFERÊNCIAS

ADAMS, P.; BRISSOT, P.; POWELL, L.W. EASL International Consensus Conference on Hemochromatosis – Part II – Expert document. **Journal of Hepatology**, 33: p. 487-496, 2000.

ANDREWS, N.C. Disorders of iron metabolism. **New England Journal of Medicine** v.341, p.1986-1995, 1999.

ANDREWS, N.C. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. **Nature Review Genetics**, v.1, n.3: p.208-217, 2000.

BABBIT, J.L.; HUANG, F.W.; XIA, Y.; SIDIS, Y.; ANDREWS, N.C.; LIN, H.Y. Modulation of morphogenic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, n.7, 2007.

BACILA, M. Ferro. In:_____ **Bioquímica Veterinária**. São Paulo: Robe Editorial, 2003, p.370-372.

BARRIOS, M.F.; DELGADO, N.F. Hpcidina: nueva molécula, nuevos horizontes. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**. [online]. sep.-dic. 2004, v.20, n.3 [citado 25 Octubre 2006], p.0-0. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-028920040003000003&lng=es&nrm=iso>. Acesso em 17 abr. 2007.

BARRIOS, M.F.; DELGADO, N.F.; RAMIREZ, P.H. Nuevos conocimientos sobre el metabolismo del hierro. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, sep.-dic. 2005, v.21, n.3, p.0-0.

BROCK, J.H.; HALLIDAY, J.W.; PIPPARD, M.J.; POWELL, L.W. **Iron metabolism in health and disease**. London: W. B. Saunders, 1994.

CORK, S.C. Iron storage diseases in birds. **Avian Pathology**, v.29, p.7-12, 2000.

EISENSTEIN, R.S.; BLEMINGS, K.P. Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. **Journal of Nutrition**. 1998, v.128, n.12, p.2.295-2298.

FAIRBANKS, V.F. Iron in medicine and nutrition. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (eds.), **Modern Nutrition in Health and Disease**. Maivem, Pennsylvania: Lea and Febiger, 1994, p.185-213.

FEDER, J.N.; GNIRKE, A.; THOMAS, W.; TSUCHIHASHI, Z.; RUDDY, D.A.; BASAVA A. et al. A novel MHC class 1-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. **Nature Genetics**, v.13: p.399-408, 1996.

FRANCO, G. Ferro (Fe). In:_____ **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. 9. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1997, p.244-247.

FRAZER, D.M.; WILDINS S.J.; BECKER, E.M.; MURPHY, T.L.; VULPE, C.D.; McKIE, A.T.; ANDERSON G.J. A rapid decrease in the expression of DMT-1 and Dcytb but not Ireg1 or hephastin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. **Gut** 52: p.340-346, 2003.

GANZ, T. Heparidin and its role in regulation systemic iron metabolism. In: BERLINDER, N.; LINKER, C.; SCHIFFER, C.A.; BAJUS, J.L. **Hematology, Education Program Book**, 2006, p.29-35. Disponível em <http://www.asheducationbook.org> Acesso em 17 abril 2007.

HENTZE, M.W.; MUCKENTHALER, M.U.; ANDREWS, N.C. Balancing Acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v.117, p.285-297, 2004.

KELLY, W.R. The liver and biliary system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. (eds). **Pathology of Domestic Animals**, 4th ed., v.2. San Diego: Academic Press, p.319-406, 1994.

KNUTSON, M.D.; OUKKA, M.; KOSS, L.M.; AYDEMIR, F.; WESSLING-RESNICK, M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulaed by hepcidin. **Proceedings** of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005, 102:p.1324-1328.

KRAUSE, A.; NEITZ S.; MAGERT, H.J.; SCHULZ, A.; FORSSANAN, W.G.; SCHULZ-KNAPPE, P.; ANDERMANN, K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bounded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS Letters**, 480: p.147-150, 2000.

LIBERATI, A.; BENHAMOU, J.P.; BERG, A.; BRAGA, S.; CARMELLI, D.; COX, T.; FERNAU, J.; FOST, N.; LUZZATTO, L.; MAGRINI, N.; MANNS, M.; PRESS, N.; ROSENBERG, W.; RODÉS, J.; WELCH, G.H. EASL International Consensus Conference on Hemochromatosis – Part III. Jury document. **Journal of Hepatology**, v.33: p.496-504, 2000.

LOWESTINE, L.J.; MUNSON, L. Iron overload in the animal kingdom. In: FOWLER, M.E., MILLER, R.E. **Zoo and Wild Animal Medicine**, Current Therapy 4. Philadelphia, W.B. Saunders, 1999, p.260-268.

METE, A.; HENDRIKS, H.G.; KLAREN, P.H.M.; DORRESTEIN, G.M.; VAN DIJK, J.E.; MARX, J.J.M. Iron metabolism in mynah birds (*Gracula religiosa*) resembles human hereditary hemochromatosis. **Avian Pathology**, 32(6), p.625-632, 2003.

METE, A.; JALVING, R.; VAN OOST, B.A.; VAN DIJK, J.E.; MARX, J.J.M. Intestinal over-expression of iron transporters induces iron overload in birds in captivity. **Blood cells, Molecules, and Diseases**, v.34, p.151-156, 2005.

NEMETH, E.; TUTTLE, M.S.; POWELSON J.; VAUGHN, M.B.; DONOVAN A.; WARD, D.M.; GANZ, T.; KAPLAN, J. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v.36: p.2090-2093, 2004.

NIEDERKOFER, V.; SALIE, R.; ARBER, S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. **The Journal of Clinical Investigation**, v.115, n.8, p.2180-2186, 2005.

NUSSBAUM, R.L.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. Thompson & Thompson Genetics in Medicine, Revised reprint, 6th edition. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. 540p.

OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=235200&itool=books&referralid=gnd.section.251> Acesso em 19 apr. 2007.

PARK, C.H.; VALORE, E.V.; WARIN, A.J.; GANZ, T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.11:7806-7811, 2001.

PÉREZ, G.; VITTORI, D.; PREGI, N.B.; GARBOSSA, G.; NESSE A. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.39, n.3, p.301-314, 2005.

PHILLIPS, J.D.; BING, G.; YU, Y.; BROWN, F.M.; LEIBOLD, E.A. Expression and biochemical characterization of Iron Regulatory Proteins 1 and 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v.35, n.4, p.15704-15714, 1996.

PIETRANGELO, A. EASL International Consensus Conference on Hemochromatosis – Part I - Introduction. **Journal of Hepatology**, v.33: p.485-486, 2000.

PIETRANGELO, A. Hemochromatosis. **Gut**; v.52, n.2, p.23-30, 2003.

PIETRANGELO, A. Hereditary hemochromatosis – A new look at an old disease. **The New England Journal of Medicine**, v.350, p.2383-2397, 2004.

PIETRANGELO, A. Molecular Insights into the Pathogenesis of Hereditary Hemochromatosis. **Gut**; v.55, p.564-568, 2006.

PIETRANGELO, A. Physiology of iron transport and the hemochromatosis genes. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.282, p.403-414, 2002.

PIETRANGELO, A.; CALEFFI, A.; HENRION, J.; FERRARA, F.; CORRADINI, E.; KULAKSIS, H.; STREMMEL, W.; ANDREONE, P.; GARUTI, C. Juvenile hemochromatosis associated with pathogenic mutations of adult hemochromatosis genes. **Gastroenterology**, v.128, p.470-479, 2005.

QUERA, R.P.; PONIACHIK, J.T.; MANCILLA, A.C. Hemocromatosis, una enfermedad por depósito. **Revista Hospital Clínico de Chile**. V.13, n.3, p.192-200, 2002.

RÉSIO, M.P.Z.; SOUZA, A.M.; TOLOI, M.R.T.; GREGÓRIO, Z.M.O.; MONTES, M.B.A.; FRANCESCHINI, S.A.; CASTRO, F.A. Effect of hormone replacement therapy in iron status. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v.39, n.4, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442003000400006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 01 Apr 2007.

RODENBUSCH, C.R.; CANAL, C.W.; SANTOS, E.O. Hemossiderose e hemocromatose em aves silvestres – Revisão. **Clínica Veterinária**, Ano IX, n.53, p.44-50, novembro/ dezembro, 2004.

RUEDA, A.C.; ÁLVAREZ, J.P. Hecpidina, una nueva proteína en la homeostasis del hierro. **Anales de Medicina Interna** (Madrid); v.20: p.605-606, 2003.

SMITH, J.E. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997, p.223-239.

SOUZA, A.F.M.; CARVALHO-FILHO, R.J.; CHEBLI, J.F. Hemocromatose hereditária – Relato de caso e revisão da literatura. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.38, n.3, 194-202, 2001.

THEURL, I.; FRITSCH, G.; LUDWICZEK, S.; GARIMORTH, K.; BELLMANN-TRINDER, D.; FOX, C.; VAUTIER, G.; OLYNYK, J.K. Molecular pathogenesis of iron overload. **Gut**; 51; p.290-295, 2002.

UNDERWOOD, E.J. Iron. In: _____ **Trace Elements in Human and Animal Nutrition**. New York: Academic Press, 1977, p.13-55.

WESSLING-RESNICK, M. Iron imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.290: p.1-6, 2006.

WHITESIDE, D.P. **Evaluation of the oral iron chelator deferiprone in the white leghorn chicken and domestic pigeon**. Guelph, Canadá, 2001. 235p. Dissertação de Doutorado em Ciências Veterinárias, The University of Guelph, Ontário, Canadá. National Library of Canadá. Disponível em: <http://www.collectionscanada.ca/obj/s4/f2/dsk3/ftp05/NQ61990.pdf>; Acessado em: 14 out. 2007.

3 ESTUDO RETROSPECTIVO DA SIDEROSE HEPÁTICA EM TUCANOS E ARAÇARIS (RAMPHASTIDAE, PICIFORMES, AVES).

RESUMO

Este trabalho é um estudo retrospectivo da siderose hepática em uma amostra de 69 tucanos e araçarís (Ramphastidae) de oito espécies, oriundos de quatro instituições, sendo três no Estado de São Paulo e uma no Estado do Paraná. Os cadáveres foram submetidos à necropsia no período de julho de 1991 a junho de 2007. Seções histológicas de tecido hepático foram processadas com técnicas de rotina e coradas com Hematoxilina e Eosina, Azul da Prússia e Tricrômio de Masson, tendo sido posteriormente submetidas a exame histopatológico. Para uniformizar a análise subjetiva das alterações histológicas, foi estabelecido um sistema de graduação. O grau de siderose hepática foi determinado pela análise histomorfométrica de imagens digitais de seções histológicas coradas com Azul da Prússia. A unidade de medida estabelecida no estudo foi a Taxa de Siderose Hepática (TSH), que é um índice percentual da área do parênquima hepático ocupada com hemossiderina e ferritina coradas com Azul da Prússia. Foi avaliada a correlação dessa taxa com alguns parâmetros biológicos, formas de manejo das aves em cativeiro, e também com lesões hepáticas. Os principais objetivos do estudo foram diagnosticar e caracterizar a siderose hepática e conhecer padrões de ocorrência e prevalência da sobrecarga de ferro e hemocromatose na população amostrada. As técnicas histopatológicas e histomorfométricas apresentaram uma correlação positiva muito forte, comprovando a utilidade do método empregado neste estudo para o diagnóstico e caracterização da siderose hepática nas aves. A espécie tucano-toco (*Ramphastos toco*) apresentou TSH significativamente maior que na espécie tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*). Não houve variação significativa da TSH entre sexos. Aves oriundas de criatórios apresentaram TSH significativamente maior que aves de zoológicos. Aves de vida livre que permaneceram menos de dois meses em cativeiro apresentaram baixa TSH. A classe de aves que sobreviveu por dois a 12 meses em cativeiro foi a que apresentou a TSH mais elevada. Doença hepática foi a *causa mortis* em 37% dos casos. As lesões hepáticas mais expressivas foram necrose (62,8%), processos degenerativos (53,5%) e processos inflamatórios (9,8%). Houve variação significativa na correlação entre TSH e lesões hepáticas, existindo entre elas correlação positiva. Diferentemente da Hemocromatose Hereditária no ser humano, não foi encontrada fibrose hepática digna de nota. Também não foi diagnosticada neoplasia hepática. A prevalência da sobrecarga hepática por ferro na população amostrada foi 30,7% e da hemocromatose 26,6%. Os resultados indicam que a siderose hepática é normalmente acompanhada de lesões hepáticas, principalmente processos degenerativos e necrose; e que doenças hepáticas são causas comuns de morte de tucanos e araçarís em zoológicos e criatórios no Brasil. Para reverter essa situação, recomendam-se medidas preventivas que aumentem a longevidade das aves em cativeiro, dentre as quais estão um correto manejo nutricional, boas práticas sanitárias e o diagnóstico precoce da sobrecarga de ferro e hemocromatose.

PALAVRAS-CHAVE: siderose, hemossiderose e hemocromatose, sobrecarga de ferro, fígado, morfometria e histomorfometria, lesões hepáticas, tucanos e araçaris.

A RETROSPECTIVE STUDY OF HEPATIC SIDEROSIS IN TOUCANS AND ARACARIS (RAMPHASTIDAE, PICIFORMES, AVES)

ABSTRACT

This is a retrospective study of hepatic siderosis in a sample of 69 toucans, araçaris and toucanets (Ramphastidae) of eight species, obtained from four institutions in Brazil: three in Sao Paulo State and one in Parana State. Carcasses were submitted to necropsy during the period of July 1991 to June 2007. Histological sections of liver tissue were processed with routine techniques, stained with Hematoxylin and Eosin, Perl's, and Masson's Tricomic stain, and finally submitted to histopathologic examination. In order to make uniform the subjective analysis of tissue alterations, it was conceived a grading system to this study. Degree of hepatic siderosis was established by means of histomorphometric analysis of digital images taken of Perl's stained histological sections. The measure unit employed in this study was the Hepatic Siderosis Index (HSI), which is an index, in percentage, equivalent to the parenchymal area filled with hemosiderin and ferritin Perl stained. It was assessed the correlation of this index with some biological parameters, animal husbandry, and also with hepatic lesions. The main objectives of the study were to diagnose and characterize hepatic siderosis, and to know pattern of occurrence and prevalence of iron overload and hemochromatosis in the studied population. A strong positive correlation was found between histopathology and histomorphometry, confirming the usefulness of the method employed in this study to the diagnosis and characterization of avian hepatic siderosis. Toco Toucans (*Ramphastos toco*) showed HSI significantly higher than Green-billed Toucans (*Ramphastos dicolorus*). There was no significant difference for siderosis index between sexes. Birds from breeding facilities had significantly higher HSI than birds from zoos. Wild birds kept in captivity for less than two months had lower rates of hepatic siderosis. The class of birds that survived in captivity for two to twelve months had the highest HSI. Hepatic diseases were *causa mortis* in 37% of the cases. Significant hepatic lesions were necrosis (62.8%), degenerative processes (53.5%), and inflammatory processes (9.8%). There was significant variation between HSI and hepatic lesions, existing a positive correlation between them. Differently of the Hereditary Hemochromatosis in human beings, hepatic fibrosis was not seen in the birds, neither liver neoplasia. Hepatic iron overload prevalence in the sampled population was 30.7% and hemochromatosis prevalence was 26.6%. Results indicated that hepatic siderosis is normally associated with hepatic lesions, mainly degenerative processes and necrosis; and that hepatic diseases are common causes of death of toucans, araçaris and toucanets in zoos and breeding centers in Brazil. To change this situation, preventive measures should be taken to increase longevity of these birds in captivity, such as proper nutritional management, sound sanitary practices, and an early diagnosis of iron overload and hemochromatosis.

KEY WORDS: siderosis, hemosiderosis and hemochromatosis, iron overload disease, liver, morphometry and histomorphometry, hepatic lesions, toucans, aracaris and toucanets.

3.1 INTRODUÇÃO

Na década de 1970, a hemocromatose ou Doença-da-sobrecarga-de-ferro (DSF) passou a ser relatada em aves insetívoras e frugívoras mantidas em cativeiro, sendo reconhecida, desde então, como uma doença comum em tucanos e araçarís, responsável por um número considerável de mortes (LOWESTINE e MUNSON, 1999). Embora nos dias atuais a sobrecarga de ferro esteja mais bem divulgada entre os criadores de aves silvestres, mortes por hemocromatose têm sido relatadas em zoológicos, criatórios e clínicas particulares no Brasil. Como se trata de uma doença que ocorre irregularmente e ao acaso e, também, por nem sempre haver o reconhecimento das alterações anatomopatológicas provocadas pela sobrecarga de ferro em órgãos parenquimais, parece existir certo desconhecimento de alguns criadores e até mesmo de médicos veterinários quanto à relevância da doença para a saúde das aves da família Ramphastidae cativas.

Além das perdas decorrentes de doenças, outro fator prejudicial ao crescimento das populações *ex-situ* de ramfastídeos é a baixa taxa reprodutiva, sendo o nascimento de filhotes ainda um evento ocasional na maioria dos zoológicos e criatórios brasileiros. JENNINGS (2001) atribuiu como fatores determinantes para o sucesso reprodutivo dos ramfastídeos: 1) Formação de casais compatíveis; 2) Viveiro adequado; 3) Dieta balanceada; e 4) Bons programas de sanidade animal. Portanto, a conservação *ex-situ* dessa família de aves requer ações eficientes em saúde e prevenção de doenças.

Embora existam relatos de casos de hemocromatose em aves silvestres mantidas em cativeiro em várias partes do mundo (WORELL, 1997; LOWESTINE E MUNSON, 1999; RODENBUSCH, 2004), não havia até o momento um estudo retrospectivo em tucanos e araçarís que fizesse a caracterização histopatológica e apresentasse parâmetros epidemiológicos da doença em uma amostra populacional de indivíduos expostos a fatores determinantes da doença.

O presente trabalho consistiu da análise de seções histológicas de fígado de 69 cadáveres de aves de oito espécies pertencentes à família Ramphastidae, que foram submetidos a necropsias em três instituições localizadas no estado de São Paulo e uma no estado do Paraná, entre os anos de 1991 e 2007. Fez-se uma

análise histopatológica descritiva categórica ordinal e análise quantitativa contínua, aplicando-se, respectivamente, um sistema interpretativo de graduação e técnicas objetivas de morfometria. Adicionalmente, buscou-se comparar as análises histopatológicas e histomorfométricas para servirem como parâmetros de referência no diagnóstico e classificação da hemossiderose e hemocromatose hepática das aves. Objetivos adicionais do estudo foram: 1) Conhecer padrões de ocorrência da siderose hepática; 2) Estabelecer parâmetros epidemiológicos e, finalmente: 3) Correlacionar a siderose hepática com lesões celulares concorrentes.

3.2 REVISÃO DE LITERATURA

3.2.1 Espécies suscetíveis

Tucanos e araçarís são aves neotropicais pertencentes à subfamília Ramphastinae, família Ramphastidae, ordem Piciformes, conhecidos popularmente como ranfastídeos. A subfamília compreende 41 espécies dos gêneros *Aulacorhynchus* (6 espécies), *Pteroglossus* (13), *Bailloni* (1), *Andigena* (4), *Selenidera* (6), e *Ramphastos* (11), que ocorrem desde o México até o nordeste da Argentina. São aves normalmente coloridas e que medem de 34 a 66cm de comprimento, conforme a espécie (SIBLEY, 1996; CUBAS, 2007). A longevidade dos tucanos é estimada entre 15 a 25 anos (JOHNSON-DELANEY e HARRISON, 1996).

3.2.2 Hábitos alimentares dos ranfastídeos

As aves da família Ramphastidae ou simplesmente ranfastídeos são onívoras. Alimentam-se principalmente de frutos e sementes de figueira, goiabeira, imbaúba, palmito, dentre outras. Comem invertebrados, tais como aranhas, cigarras, grilos, cupins e outros insetos alados. Capturam e consomem ovos e filhotes de pássaros, sendo presas comuns guaxe *Cacicus haemorrhous* e xexéu *Cacicus cela* (SICK, 1997; CUBAS, 2007). Podem eventualmente consumir folhas e flores. Pequenas sementes passam pelo intestino e sementes maiores são regurgitadas, o que torna

os ranfastídeos importantes dispersores de sementes na região Neotropical (MIKICH, 2001).

Em cativeiro, tucanos e araçarís são normalmente alimentados com frutas e ração comercial. Ovo cozido, pedaços de carcaça de roedores e invertebrados produzidos em laboratório são alimentos fornecidos eventualmente em alguns zoológicos. Rações para cães e gatos não são recomendadas por apresentarem níveis de ferro muito superiores às necessidades destas aves, estimadas em torno de 65ppm (LOWESTINE e MUNSON, 1999; SHEPPARD e DIERENFELD, 2002; DIERENFELD et al., 1994; CUBAS, 2003; CUBAS, 2007). A adição de chá verde na água ou comida é recomendada por alguns autores com a intenção de reduzir a biodisponibilidade de ferro no intestino (SEIBELS et al., 2003; CUBAS, 2007).

3.2.3 Reprodução dos ranfastídeos em cativeiro

Embora haja relatos de reprodução de ranfastídeos desde a década de 1960 em zoológicos e criatórios na América do Norte, Europa e América do Sul (JENNINGS, 2001; CZIULIK, 2006), o nascimento de filhotes é ainda esporádico, talvez pela inexistência de populações estáveis. Vários fatores parecem contribuir para uma baixa eficácia reprodutiva, dentre os quais estão: 1) Pareamento de aves incompatíveis; 2) Viveiros mal planejados; 3) Dieta não balanceada; e 4) Ausência ou ineficiência de programas de sanidade (JENNINGS, 2001). É possível que a ocorrência de problemas hepáticos afete diretamente a capacidade de reprodução dos tucanos cativos, uma vez que o fígado desempenha função primordial na formação do óvulo (CORNELISSEN e RITCHIE, 1994).

3.2.4 Termos médicos e definições no contexto da siderose hepática

O ferro é estocado no organismo sob duas formas: ferritina e hemossiderina. Aparentemente a hemossiderina é produto da degradação da ferritina por proteases lisossomais (BRAGA e BARBOSA, 2006). É importante lembrar a correta definição dos termos empregados quando se aborda as alterações no organismo decorrentes do metabolismo do ferro. Por exemplo, siderose é um termo genérico para designar

o acúmulo de ferro em um órgão qualquer na forma de hemossiderina e ferritina. Já o termo hemossiderose é mais específico, usado quando ocorre uma deposição progressiva de hemossiderina e ferritina em tecidos, sem que haja alteração considerável na morfologia celular nem dano tecidual extenso que altere a competência funcional do órgão envolvido. Na hemossiderose, a morte de hepatócitos, quando ocorre, é do tipo necrose celular isolada sem desdobramento tecidual extenso ou significativo (CARCIOFI e OLIVEIRA, 2007). O termo hemocromatose é empregado para a doença caracterizada por acúmulo de hemossiderina e ferritina em órgãos parenquimatosos, principalmente no fígado, e que causa danos à estrutura histológica e à função dos órgãos acometidos (LOWESTINE, 1986; LOWESTINE e MUNSON, 1999; RODENBUSCH, 2004, CARCIOFI e OLIVEIRA, 2007). Os termos Doença do Depósito de Ferro (*iron storage disease*) ou DDF e Doença da Sobrecarga de Ferro (*iron overload disease*) ou DSF são fiéis traduções empregadas para designar a hemocromatose em animais, diferenciando-a, desta forma, da Hemocromatose Hereditária que acomete seres humanos (LOWESTINE e MUNSON, 1999; DREWS et al., 2004). Nesta dissertação são utilizados os termos *siderose* e *depósito de ferro* com um sentido abrangente, para descrever a deposição de hemossiderina e ferritina coradas por Azul da Prússia, sem levar em conta a extensão dos depósitos e possíveis alterações morfofuncionais no tecido hepático. Os vocábulos *hemossiderose* e *sobrecarga de ferro* são utilizados como sinônimos, bem como *hemocromatose* e *DSF*.

3.2.5 Patogenia da sobrecarga de ferro

A patogenia da sobrecarga de ferro em aves não está plenamente conhecida (LOWESTINE e MUNSON, 1999; CORK, 2000; WHITESIDE, 2001), mas sabe-se que existem espécies naturalmente sensíveis aos depósitos excessivos de ferro, e que a alta capacidade de absorção intestinal do elemento e sua retenção no organismo são determinadas por fatores genéticos evolutivos naturalmente adquiridos e inerentes às espécies, diferentemente da Hemocromatose Hereditária,

que se manifesta apenas em indivíduos com mutações genéticas específicas que causam a doença (DORRESTEIN et al., 2000; WHITESIDE, 2001).

3.2.5.1 Fatores genéticos da sobrecarga de ferro

O acúmulo de hemossiderina no fígado é descrito em várias espécies, sendo mais comum em aves frugívoras e insetívoras como mainás e estorninhos (Passeriformes, Sturnidae), calaus (Bucerotiiformes), aves-do-paraíso (Paradisaeinae), lóris (Psittaciformes), e tucanos e araçaris (FRANKENHUS e ASSINK, 1981; WADSWORTH et al., 1983; TAYLOR, 1984; GERLACH et al, 1998; CUBAS, 2007). Embora existam publicações de casos clínicos (WORELL, 1997; LOWESTINE E MUNSON, 1999; RODENBUSCH, 2004), estudos retrospectivos de sobrecarga de ferro em populações de aves da família Ramphastidae são inexistentes.

A taxa de absorção intestinal de ferro no ser humano é influenciada pelos estoques de ferro, ajustando-se às necessidades do organismo. Em estado de carência de ferro, a absorção pode aumentar em até quatro vezes, chegando a 30% do montante ingerido. Já em situações de sobrecarga, a absorção do mineral pode ser inferior a 1% (CORNELISSEN et al., 1995, CRISSEY et al, 2000; WHITESIDE, 2001; BRAGA e BARBOSA, 2006). Sabe-se que em galinha também ocorre controle fisiológico da absorção intestinal de ferro, mas em espécies silvestres suscetíveis à sobrecarga de ferro, isso parece não ocorrer. Foi demonstrado que em aves-do-paraíso (Paradisaeinae) a taxa de absorção pode ser de até 90% do ferro consumido, persistindo alta mesmo quando os estoques orgânicos de ferro são elevados (FRANKENHUIS et al., 1989). Em mainás (*Gracula religiosa*), uma alta biodisponibilidade de ferro se deve à alta expressão das proteínas transportadoras DMT-1 e ferroportina, existentes nos enterócitos de todo o intestino. Isto se atribui a mecanismos genéticos de adaptação ao ambiente no qual as espécies evoluíram, possivelmente como forma de compensação pela pouca oferta de alimentos ricos em ferro em seu habitat (METE et al., 2003; METE et al., 2005). Portanto, nas aves de espécies suscetíveis, além da alta taxa de absorção de ferro, parece não haver mecanismo de bloqueio da absorção na mucosa intestinal, o que causa excessiva

deposição de ferro intracelular (GOSSELIN e KRAMER, 1983; DIRENFELD et al., 1994; CORNELISSEN et al., 1995; CORK, 2000; WHITESIDE, 2001).

3.2.5.2 Fatores nutricionais da sobrecarga de ferro

Além do fator genético, a nutrição é determinante na patogenia da hemocromatose ou DSF. A ingestão prolongada de grandes quantidades de ferro de alta biodisponibilidade pode causar sobrecarga em vertebrados (CORK, 2000; SHEPPARD e DIRENFELD, 2002). Em aves de espécies suscetíveis (ou sensíveis), o acúmulo de hemossiderina/ ferritina no fígado pode ser induzido experimentalmente pela ingestão continuada de grandes quantidades do mineral (CRISSEY et al., 2000; OLSEN et al., 2006). Esta constatação favorece a hipótese de que é a ingestão de altos níveis de ferro que determina a DSF nas aves silvestres (DORRESTEIN et al., 1992; LUMEIJ, 1997; LOWESTINE e MUNSON, 1999).

CRISSEY et al. (2000) induziram sobrecarga hepática em estorninhos europeus (*Sturnus vulgaris*) pela oferta diária de alimento com quantidade excessiva de ferro (3035ppm/ kg matéria seca). As aves foram avaliadas com oito e 16 semanas e o resultado foi que a sobrecarga hepática por ferro ocorreu apenas em aves que ingeriram o alimento sobredosado com ferro por 16 semanas. Esse trabalho demonstrou que a sobrecarga de ferro nas aves suscetíveis pode ocorrer num prazo relativamente curto de semanas a poucos meses.

A baixa oferta de inibidores da biodisponibilidade do ferro na dieta, tais como cálcio, compostos fenólicos (tanino), ácido fítico (presente em sementes de cereais, leguminosas e oleaginosas) e certas proteínas, como a da soja e a ovoalbumina, favorecem a patogênese da sobrecarga de ferro (SPELMAN et al., 1989; DIRENFELD et al., 1994; LOWESTINE e MUNSON, 1999; COLLI, 2006; CUBAS, 2007)

3.2.6 Alterações histológicas decorrentes da sobrecarga de ferro

No ser humano, podem ser vistos depósitos de ferro no fígado, coração, pulmão, órgãos endócrinos, epitélio tubular renal e macrófagos esplênicos

(GOSSELIN e KRAMER, 1983; WHITESIDE, 2001). O padrão de depósito de ferro nas células difere na hemocromatose primária e secundária do Homem. Na Hemocromatose Hereditária ou primária, os macrófagos apresentam pouca reserva de ferro, ainda que a sobrecarga de ferro seja marcante nos hepatócitos e em outros órgãos. Na hemocromatose secundária, as Células de Kupffer, macrófagos, hepatócitos e outras células parenquimais estão repletas de ferro (FAIRBANKS, 1994; ANDREWS, 1999; WHITESIDE, 2001).

O simples acúmulo de ferro no fígado pode não ser suficiente para provocar manifestação clínica; são necessárias lesões de grande extensão para caracterizar a hemocromatose como entidade clínica. Um achado consistente nas aves é necrose isolada de hepatócitos com fibrose intersticial (WHITESIDE, 2001). Pode haver inflamação com infiltrado de linfócitos e heterófilos e carcinoma hepatocelular (WHITESIDE, 2001). Em estágio avançado da doença, pode ocorrer necrose hepática de grau variável e fibrose (CORK, 2000; SCHMIDT et al., 2003). Os achados necroscópicos incluem alterações no tamanho e cor do fígado, que pode variar de vermelho intenso por causa da congestão até castanho, indicativo de lesões. Eventualmente ocorre ascite e edema pulmonar (CUBAS, 2007) [Figuras 1 e 2].

FIGURA 1 – Fotografia de cavidade celomática de tucano-toco (*Ramphastos toco*) que veio a óbito em decorrência de insuficiência hepática e hemocromatose. Note o aspecto do fígado com manchas claras circulares e coloração parda (setas) indicativas de avançado processo degenerativo e necrose celular.

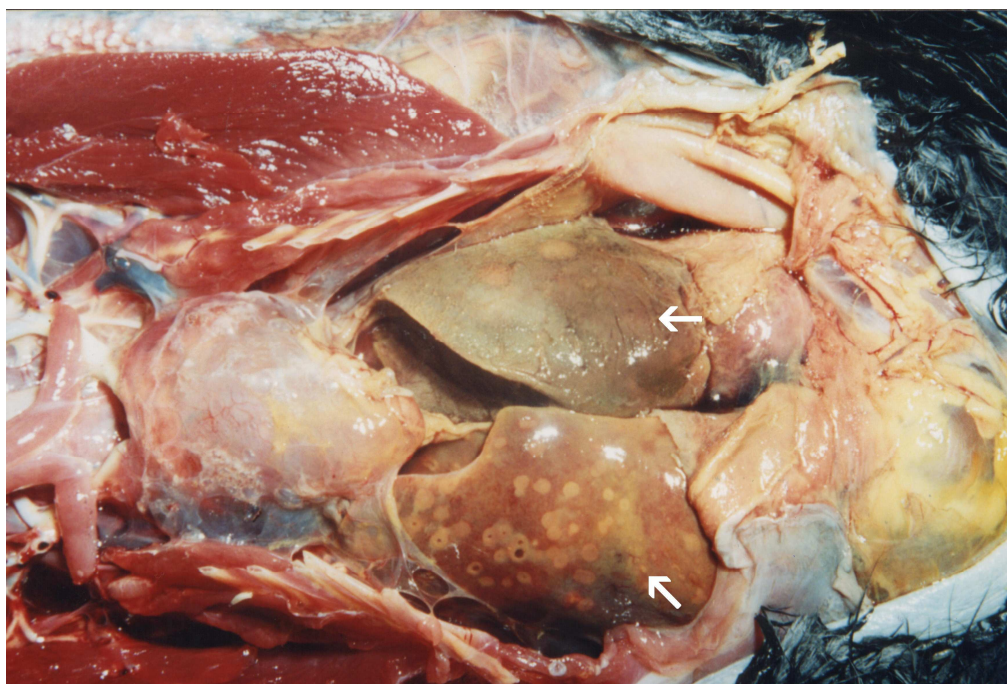


FIGURA 2 – Fotografia de necropsia de tucano-toco (*Ramphastos toco*) que veio a óbito por insuficiência hepática e hemocromatose. Note o acúmulo de líquido ascítico (seta) e hepatomegalia.



3.2.7 Sinais clínicos

Os sinais clínicos da hemocromatose ou DSF são variáveis. Algumas aves podem morrer sem apresentar qualquer sinal clínico óbvio, já outros indivíduos podem manifestar apenas sinais inespecíficos como fraqueza generalizada, dispnéia, emagrecimento crônico, má aparência das penas, cardiomegalia e distensão abdominal em decorrência da hepatomegalia e ascite (Figura 2). A morte ocorre normalmente por insuficiência hepática e cardíaca (SPALDING et al., 1986; MORRIS et al., 1989; WORELL, 1991a,b; WORELL, 1993; CORNELISSEN et al., 1995; LOWESTINE e MUNSON, 1999; WHITESIDE, 2000; CUBAS, 2007).

3.2.8 Diagnóstico

A suspeita de hemocromatose em aves surge a partir dos sinais clínicos, anamnese, resultados de exames de bioquímica sérica e análise de imagens radiográficas, ultra-sonográficas ou endoscópicas (CUBAS, 2007).

O teste padrão-ouro para o diagnóstico da hemocromatose em animais e também no ser humano é a biopsia hepática (ANDREWS, 1999, LOWESTINE e MUNSON, 1999, WHITESIDE, 2001; SOUZA et al., 2001). O exame histopatológico, além da siderose, permite avaliar lesões celulares como fibrose, cirrose e neoplasia (WHITESIDE, 2001). A quantidade de ferro nas amostras de tecido hepático pode ser quantificada por: 1) Análise histopatológica feita de forma subjetiva, a partir da experiência do patologista, ou utilizando critérios de graduação para determinar a extensão dos depósitos de ferro; 2) Espectrofotometria de absorção atômica; 3) Análise histomorfométrica de imagens digitais de seções histológicas coradas com Azul da Prússia; 4) Microanálise de raios-x em microscopia eletrônica (CORNELISSEN et al., 1995; CORK et al., 1995; WHITESIDE, 2001).

Técnicas não invasivas modernas incluem análise de imagens por Ressonância Magnética (MRI), Susceptometria Biomagnética (BMS) e pelo magnetômetro supercondutor denominado SQUID, que pode quantificar a concentração de ferro hepático, ainda que os equipamentos atuais não sejam tão eficientes a ponto de detectar baixas concentrações de ferro no parênquima.

Infelizmente, são técnicas caras e praticamente indisponíveis na clínica veterinária (WHITESIDE, 2001; NIELSEN et al., 2002; ORTEGA et al., 2005).

Exames hematológicos e bioquímicos apresentam limitado valor no diagnóstico da sobrecarga de ferro, pois os parâmetros nem sempre se encontram alterados. Os ácidos biliares tendem a apresentar valores no limite de normalidade (FUDGE, 2000). Hipoproteinemia e outras evidências de insuficiência hepática podem levantar suspeita de hemocromatose. Testes específicos para avaliar a quantidade de ferro no organismo incluem dosagem do ferro sérico e o Índice de Saturação da Transferrina (IST) [LOWESTINE e MUNSON, 1999]. Enquanto em mamíferos a saturação de transferrina deve estar em torno de 33%, nas aves pode chegar a 80% (LOWESTINE e MUNSON, 1999). IST para tucano-toco (*R. toco*) cativos podem variar de 20 a 33% (GOULART e CUBAS, 2002). A dosagem da ferritina no ser humano é feita por ensaio imunoradiométrico, a partir de anticorpos monoclonais e policlonais anti-ferritina, portanto, é um ensaio específico para a espécie humana, inviabilizando seu uso em aves silvestres (DORRESTEIN et al., 1992; LOWESTINE e MUNSON, 1999). Contudo, sabe-se que reação cruzada com a ferritina de espécies filogeneticamente assemelhadas pode ocorrer (LOWESTINE e MUNSON, 1999; WHITESIDE, 2001). Isso cria a possibilidade de diagnóstico da sobrecarga de ferro em aves silvestres a partir de testes desenvolvidos para aves domésticas.

O diagnóstico de portadores da Hemocromatose Hereditária no ser humano é feito por teste que identifica a mutação C282Y no gene HFE, alteração genética que produz a forma mais comum da doença (BRAGA e HOKAZONO, 2006). Em animais, um teste genético para identificar indivíduos com mutações para a hemocromatose não faz sentido, pois a etiologia da doença é outra.

A dosagem bioquímica do ferro em parênquima hepático é um método eficiente, preconizado no diagnóstico da Hemacromatose Hereditária. Porém, pode não refletir a real condição do paciente, principalmente quando uma pequena amostra de tecido hepático retirada por biópsia contém grande quantidade de tecido fibroso (GUYADER e GANDON, 2000). Outra desvantagem deste método é que a amostra de tecido hepático deve ser grande o suficiente para permitir a extração de ferro para análise bioquímica, o que representa desconforto e mais risco para o paciente durante o procedimento cirúrgico (ORTEGA et al., 2005).

3.2.8.1 Histopatologia e graduação das lesões hepáticas

O exame de seções histológicas de fígado coradas com Azul da Prússia revela depósitos de hemossiderina e ferritina nos hepatócitos em diferentes tonalidades de azul. O ferro também pode ser depositado em células do sistema mononuclear-fagocítico, incluindo células de Kupffer no fígado e macrófagos no baço. Esses depósitos podem estar associados a doenças concorrentes como anemia hemolítica, saturnismo e caquexia (LOWESTINE e MUNSON, 1999; CORK, 2000; WHITESIDE, 2001). Quando o corante utilizado é Hematoxilina e Eosina, os depósitos de hemossiderina são vistos como grânulos acastanhados (SCHMIDT et al., 2003).

DEUGNIER et al. (1992) estabeleceram um sistema de graduação semiquantitativa para a análise histológica da siderose. Este sistema de graduação por escores demonstrou boa correlação com a dosagem bioquímica de ferro hepático. Outros autores ressaltam, contudo, que é um método trabalhoso e subjetivo (ORTEGA et al., 2005).

3.2.8.2 Histomorfometria das lesões hepáticas

A análise de imagem digital é um método utilizado para quantificar a extensão dos depósitos de ferro nos tecidos (ORTEGA et al., 2005). Os programas de computador de análise de imagem digital dispõem de recursos complexos de análise gráfica que permitem diferenciar padrões de cor e de imagem, sendo adequados para análise histomorfométricas de padrões histológicos e citológicos (MELO-JÚNIOR et al., 2006).

Compreende-se por morfometria a quantificação de estruturas visíveis numa lamina histológica, de forma bidimensional. As características tridimensionais são objetos de estudo de outra ciência: a estereologia. O que se vê na histopatologia são secções de estruturas, que muitas vezes não refletem a verdadeira magnitude das mesmas (STREFEZZI, 2007).

O primeiro estudo comparativo entre análise bioquímica de ferro hepático e análise por imagem foi realizado em 1982 e os resultados foram promissores, obtendo-se coeficiente de correlação igual a 0,9 (DEUGNIER et al., 1982). Outros estudos realizados em amostras de fígado de animais e de pessoas indicaram resultados semelhantes aos de DEUGNIER et al. (1982), com boa correlação entre as análises morfométricas e bioquímicas (OLYNYK et al., 1990; MASUDA et al., 1993; ROELS et al., 1996). CORK et al. (1995) demonstraram em um experimento em frangos, que há boa correlação entre mensuração de depósitos de ferro por morfometria e análise bioquímica da concentração de ferro em parênquima hepático. ROELS et al. (1996) realizou estudo para avaliar alterações na quantidade de ferro depositado no fígado de um tucano-de-bico-preto (*Ramphastos vitellinus*) que apresentou hemocromatose, e que foi tratado com deferroxamina, concluindo que houve boa correlação entre a análise bioquímica e duas técnicas de análise de imagem (uma para imagem em preto e branco e a outra para imagem colorida). COSTA e CATÃO-DIAS (2000) realizaram análise morfométrica da siderose no fígado de diversas espécies de aves silvestres, utilizando o programa de computador OPTIMAS para análise de imagens de seções histológicas coradas com Azul da Prússia. DREWS et al. (2004) utilizaram a análise de imagem para verificar se houve redução das reservas de hemossiderina no fígado de dois tucanos-toco (*R. toco*) que sofriam de hemocromatose, após baixarem os níveis de ferro dietético para menos de 100ppm. Biopsias hepáticas seriadas foram realizadas em intervalo de oito meses e seções histológicas foram analisadas com o programa Image ProPlus (4.0 Windows, Media Cybernetics), tendo sido concluído que foi um método adequado para determinação dos depósitos de ferro em parênquima hepático de aves.

ORTEGA et al. (2005) utilizaram a análise de imagem para quantificar a carga de ferro em 64 amostras de fígado de pessoas, utilizando técnicas histológicas de rotina coradas com Azul da Prússia. Foram empregados dois métodos de quantificação do ferro hepático: a análise bioquímica e a análise histológica semiquantitativa por imagem (morfometria). Um sistema de análise de imagens semi-automático foi utilizado para determinar a percentagem de área de tecido corado com Azul da Prússia (programa de computador Microimage ver. 4.0). Houve uma correlação significativa pelo teste de Spearman entre as variáveis concentração de ferro em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido hepático seco (análise bioquímica) e índice

morfométrico percentual (análise de imagem). Os autores concluíram que a análise de imagem pode ser um método válido para quantificar depósitos de ferro em pacientes com doenças hepáticas.

Portanto, a partir dos resultados obtidos em todos esses trabalhos (DEUGNIER et al., 1982; OLYNYK et al., 1990; CORK et al., 1995, ROELS et al., 1996; COSTA e CATÃO-DIAS, 2000; DREWS et al., 2004; ORTEGA et al., 2005) considera-se que a análise de imagem digital com programas de computadores é uma ferramenta adequada para realizar estudos retrospectivos, principalmente quando não se dispõe de amostras viáveis para a análise bioquímica ou quando se busca averiguar a distribuição de certo constituinte nos tecidos (COSTA e CATÃO-DIAS, 2000).

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Origem do material biológico

O material de análise consistiu de lâminas montadas com cortes histológicos de fígado de 69 cadáveres de aves de oito espécies, pertencentes à família Ramphastidae, subfamília Ramphastinae, sendo 46 (66,7%) tucanos-toco (*Ramphastos toco*), dez (14,5%) tucanos-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*), três (4,4%) araçarís-castanhos (*Pteroglossus castanotis*), dois (2,9%) tucanos-de-bico-preto (*Ramphastos vitellinus*), dois (2,9%) araçarís-pocas (*Selenidera maculirostris*), dois (2,9%) araçarís-bananas (*Bailloni bailloni*), um (1,4%) tucano-de-peito-branco (*Ramphastos tucanus*), um (1,4%) araçari-de-letra (*Pteroglossus inscriptus*) e dois (2,9%) tucanos de espécies não determinadas.

O material de estudo foi disponibilizado por quatro instituições colaboradoras, três no Estado de São Paulo e uma no Paraná, sendo 32 (46,4%) amostras do Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal – São Paulo; 14 (20,3%) do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMZV - USP); 13 (18,8%) da Fundação Parque

Zoológico de São Paulo (FPZSP); e 10 (14,5%) do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (ITAIPU), Foz do Iguaçu – Paraná.

O material cedido pela USP e UNESP é de aves oriundas de zoológicos e criatórios no Brasil, enviadas para estas instituições para tratamento clínico ou necropsia. Todo o material da FPZSP e ITAIPU é originário dessas mesmas instituições, que por atuarem como zoológico e criatório, respectivamente, mantêm acervo próprio de animais.

3.3.2 Coleta e fixação do material biológico

O material para análise foi coletado em necropsias realizadas no período de julho de 1991 a junho de 2007, por médicos veterinários das próprias instituições colaboradoras, não havendo uma padronização rigorosa das técnicas necroscópicas nem da fixação do material. De modo geral, o material disponibilizado para o estudo foi fixado em solução de formalina a 10% (formalina 40% misturada em água na proporção 1:9, respectivamente) e mantido nesse fixador por período variável, desde a necropsia até a montagem das lâminas.

3.3.3 Histórico do material biológico

As informações solicitadas às instituições colaboradoras foram: espécie, sexo, identificação, data do óbito, idade, origem da ave (criatório, zoológico, vida livre), tempo em cativeiro, causa da morte e achados necroscópicos.

Foram consideradas aves de vida livre aquelas com histórico de terem permanecido menos de sete dias em cativeiro, normalmente retiradas de seu meio em razão de acidentes traumáticos.

3.3.4 Preparação histológica

Todas as etapas de preparação histológica do material foram realizadas no Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São

Paulo (USP), exceto dez amostras da Itaipu Binacional, cujas seções histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina foram preparadas no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica (PUC), Curitiba - Paraná.

As amostras de tecido hepático fixadas sofreram processamento histológico conforme técnicas rotineiras de inclusão em parafina, que consiste nas etapas de desidratação, diafanização, inclusão em parafina líquida, secção de 5µm de espessura e montagem sobre lâmina de vidro.

As colorações realizadas foram Hematoxilina e Eosina (EO), Azul da Prússia (AP) e Tricrômio de Masson (TM), conforme técnicas-padrão.

3.3.5 Análise histopatológica

A análise histopatológica foi feita por dois observadores de forma simultânea. A análise foi realizada no Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP), entre os meses de setembro e novembro de 2007. Foi utilizado microscópio ótico² com aumentos de 40, 100, 200 e 400x.

Foram estabelecidos critérios de graduação para a análise das alterações histológicas e siderose. No momento da análise os observadores não tiveram acesso a informações de necropsopia e morfometria.

As alterações histológicas avaliadas em tecidos corados com HE foram: 1) Autólise; 2) Processos degenerativos; 3) Necrose; 4) Processos inflamatórios; 5) Fibrose; 6) Hiperplasia de dutos biliares; 7) Neoplasia; 8) Presença de grânulos e agregados corados em castanho, sugestivos de depósito de hemossiderina e ferritina. Não foi levada em conta a localização das alterações histológicas em relação aos lóbulos hepáticos (Quadro 2).

Em seções histológicas coradas com AP, foi verificada a presença de grânulos e agregados corados em azul, indicativos de depósitos de hemossiderina e ferritina (Quadro 3). O sistema de graduação estabelecido para a extensão dos

² Olympus® BX40F4 (Melville, NY, USA).

depósitos de ferro compreendeu escores de zero a três, sendo: “0” ausente ou sutil; “1” leve; “2” moderado; e “3” severo (Figuras 3, 4, 5 e 6). Não foi levada em conta a localização dos depósitos de ferro em relação aos lóbulos hepáticos.

FIGURA 3 – Fotomicrografia ótica representativa de fígado de araçari-poca (*Selenidera maculirostris*) sem depósito de hemossiderina. Coloração Azul da Prússia. Magnificação: 400x

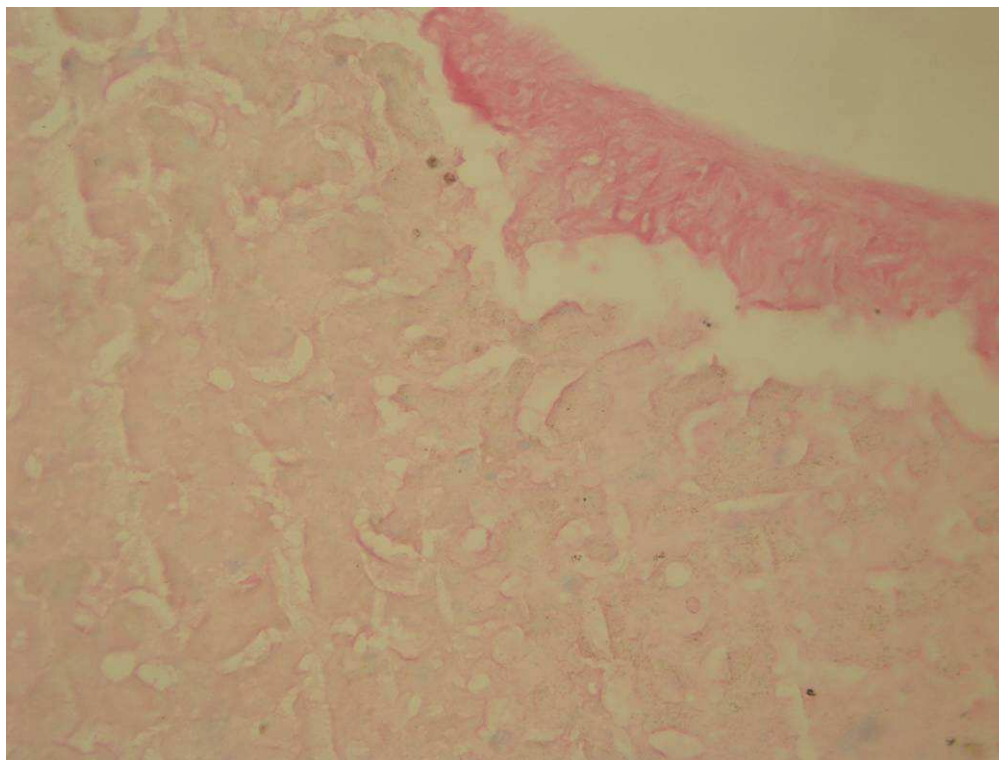


FIGURA 4 – Fotomicrografia ótica representativa de depósitos leves de hemossiderina (áreas coradas em azul) no fígado de um araçari-castanho (*Pteroglossus castanotis*). Coloração Azul da Prússia. Magnificação: 400x

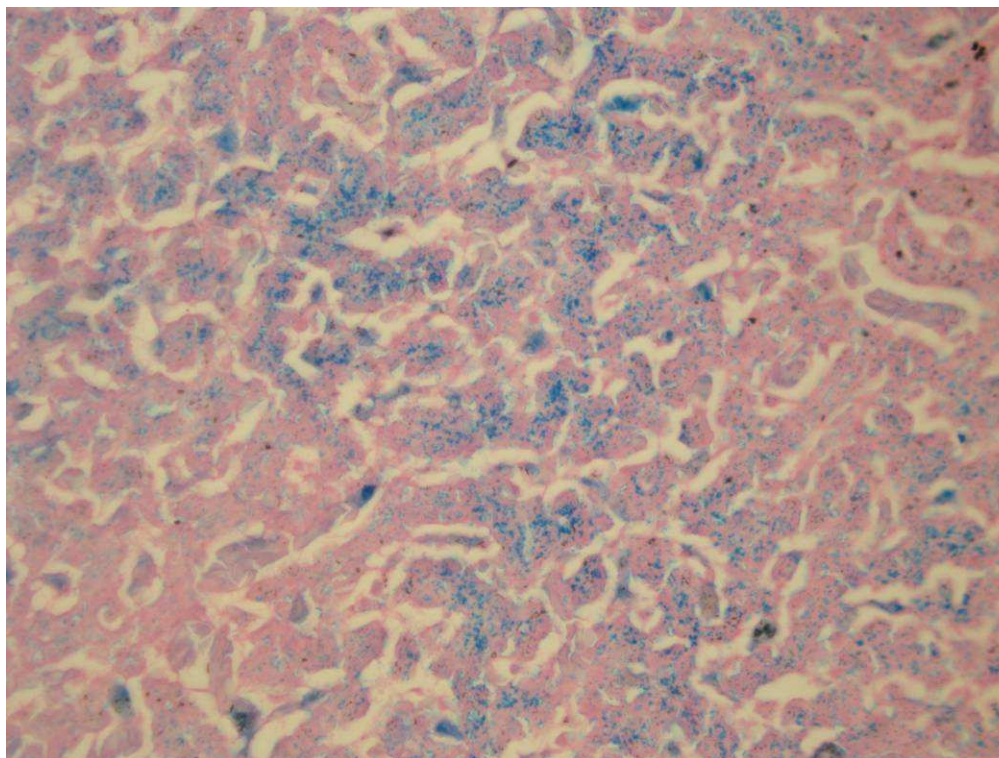


FIGURA 5 – Fotomicrografia ótica representativa de depósitos moderados de hemossiderina (áreas coradas em azul) no fígado de um tucano-toco (*Ramphastos toco*). Coloração Azul da Prússia. Magnificação: 400x

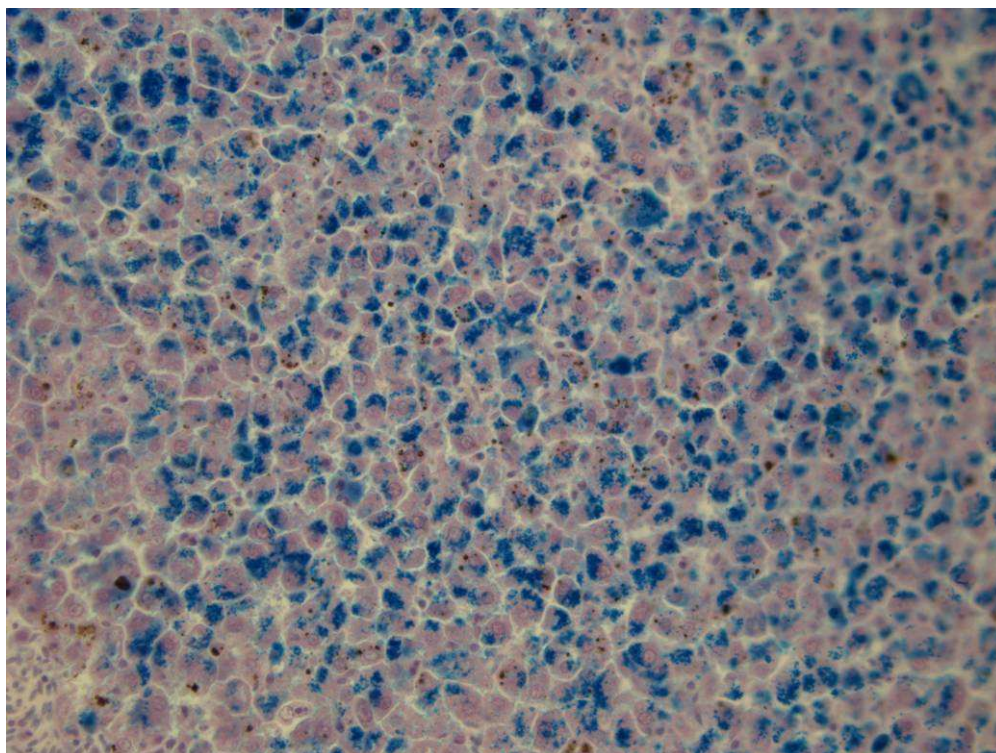
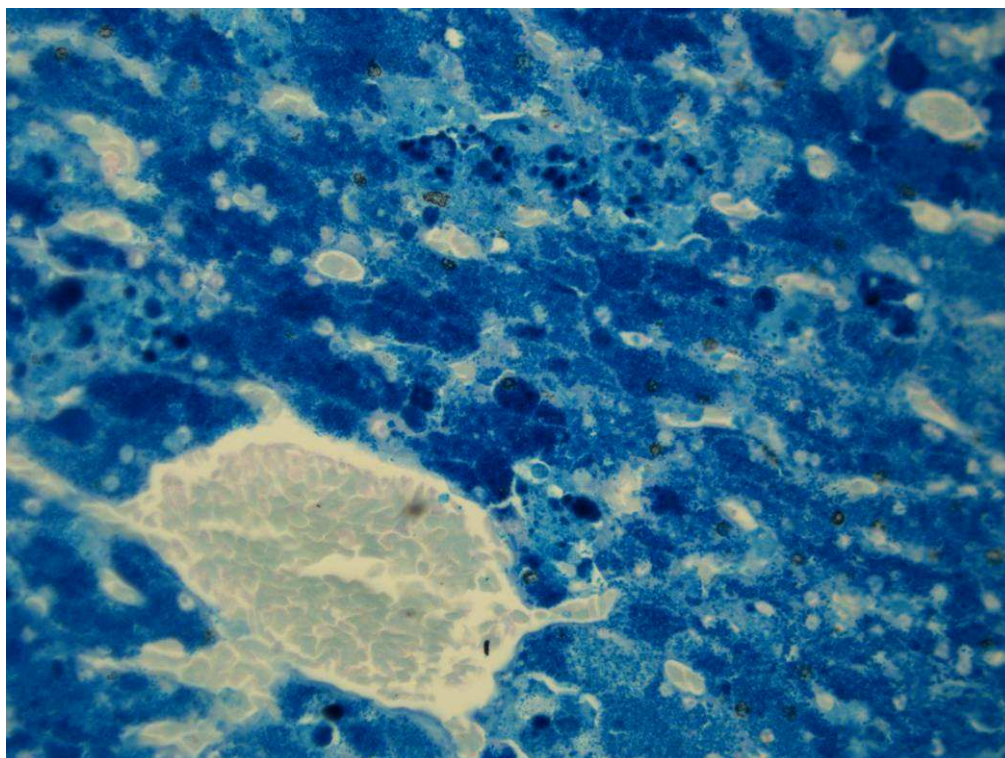


FIGURA 6 – Fotomicrografia ótica representativa de depósitos severos de hemossiderina ocupando extensas áreas da lâmina (áreas coradas em azul) no fígado de um tucano-toco (*Ramphastos toco*). Coloração Azul da Prússia. Magnificação: 400x



Para as alterações celulares, o sistema de graduação compreendeu escores de zero a três, sendo: “0” ausentes ou sutis; “1” leves; “2” moderadas; e “3” severas. Na determinação do escore levou-se em conta a intensidade da alteração celular e a extensão das alterações na lâmina. A extensão das alterações foi estimada, não tendo sido feita análise morfométrica ou qualquer outra forma de mensuração (Figuras 7 e 8).

Foi atribuído um escore acumulado, que é a soma dos escores de cada alteração histológica, ou seja, os escores determinados para processos degenerativos, necrose, processos inflamatórios, fibrose, hiperplasia de dutos biliares e neoplasia. A grade de classificação do escore acumulado foi estabelecida com base no fato de que um único escore individual “3” (alteração severa) já seria suficiente para caracterizar uma lesão hepática de gravidade considerável. Portanto, escores acumulados acima de “3” foram classificados como de gravidade moderada a severa.

As classes para tempo de manutenção das aves em cativeiro foram definidas com base no estudo de CRISSEY et al. (2000), que não conseguiram induzir sobrecarga hepática em estorninhos europeus (*Sturnus vulgaris*) após oito semanas de consumo de alimento com níveis excessivos de ferro. Para analisar a relação tempo de manutenção das aves em cativeiro e grau de siderose hepática, as amostras foram distribuídas em três classes: a primeira, com aves que permaneceram desde um dia até dois meses em cativeiro (< 2 meses), sendo a intenção abranger nessa categoria aves de vida livre que não permaneceram tempo suficiente em cativeiro para sofrer sobrecarga hepática. A segunda classe, a de aves mantidas em cativeiro de dois a 12 meses, foi estabelecida de forma aleatória, inferindo-se que abrangeria aves que permaneceram tempo suficiente para serem acometidas por sobrecarga de ferro, conforme estudo de CRISSEY et al. (2000). O terceiro grupo incluiu aves com mais de 12 meses de cativeiro, as quais poderiam apresentar não apenas sobrecarga de ferro, mas também lesões celulares hepáticas significativas.

Seções histológicas de fígado de dez casos que apresentavam depósitos de hemossiderina com escore “0” (ausente ou sutil) até “3” (elevado) foram coradas com Tricrômio de Masson. As lâminas foram submetidas à análise histopatológica

subjetiva para diagnosticar a presença de colágeno em parênquima hepático, distribuído em padrão característico de fibrose (Figura 9).

FIGURA 7 – Fotomicrografia de fígado de araçari-banana (*Bailloni* *bailloni*). Note processo degenerativo extenso com a presença de inúmeros vacúolos intracitoplasmáticos e aumento de células inflamatórias granulocíticas. Coloração HE.

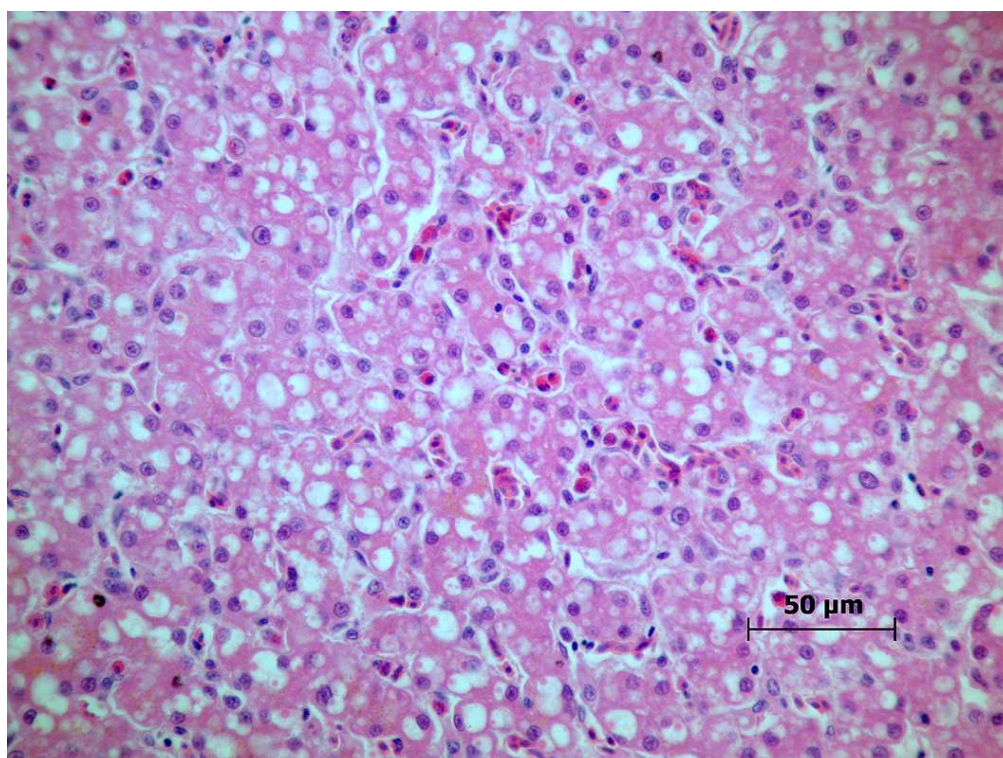


FIGURA 8 – Fotomicrografia de fígado de tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*). Note extensa área de necrose focal no centro da imagem. Coloração HE.

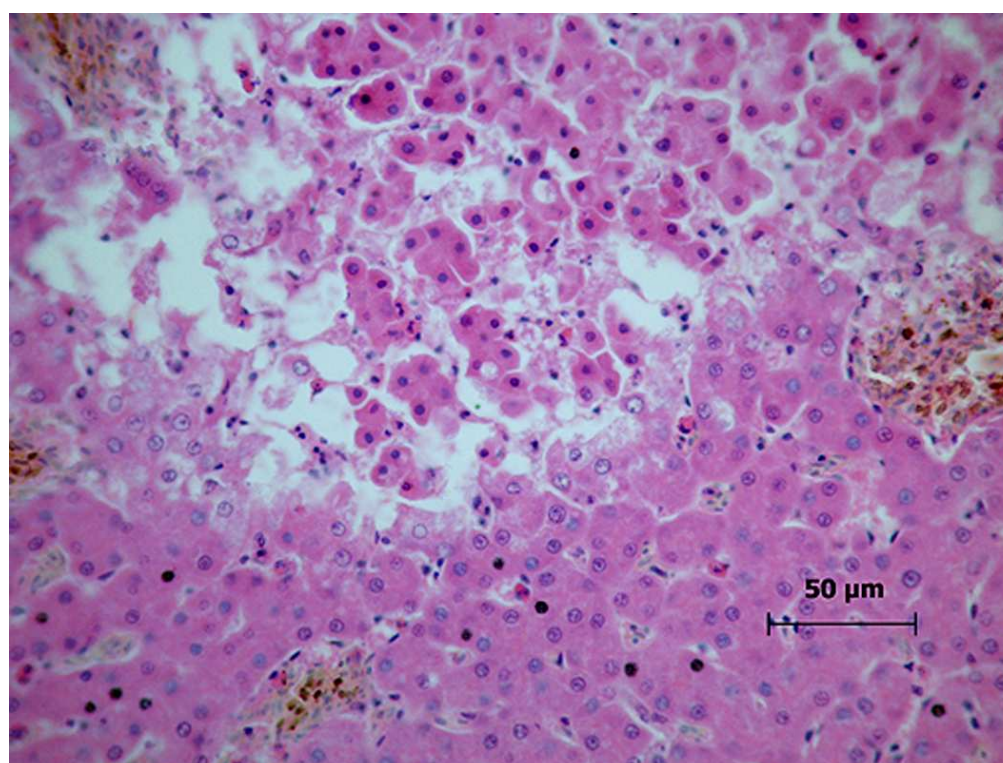
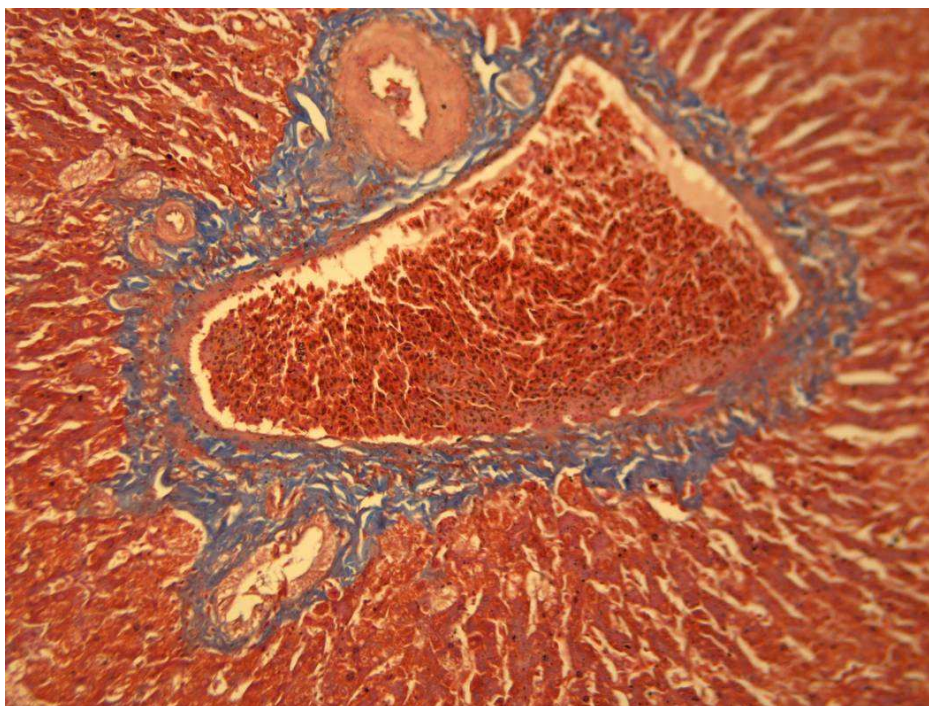


FIGURA 9 – Fotomicrografia de fígado de tucano-toco (*Ramphastos toco*) evidenciando espaço porta com seus componentes característicos: uma artéria, uma veia, um duto bilífero, vasos linfáticos e tecido conjuntivo (em azul). Coloração Tricrômio de Masson. Magnificação: 400x.



QUADRO 2 - SISTEMA DE GRADUAÇÃO PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADO COM COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA

continua

ALTERAÇÃO CELULAR	DEFINIÇÃO*	ESCORE	CARACTERÍSTICAS
Autólise	Autodigestão <i>post mortem</i> das células por enzimas contidas em suas organelas (lisossomos). Assemelha-se à necrose de coagulação - os núcleos geralmente desaparecem, mas a forma celular é preservada, permitindo reconhecer a arquitetura tecidual. Posteriormente o tecido é liquefeito.	0	Ausente.
		1	Estágio inicial e/ou áreas pequenas acometidas (até 20% da área da secção na lâmina).
		2	Estágio intermediário e/ou áreas moderadas acometidas (20 a 50% da área da secção na lâmina).
Processos degenerativos	Tumefação celular: aumento do volume das células, obliteração de estruturas intracelulares e vacuolação do citoplasma. Degeneração hidrópica: vacuolação do citoplasma, geralmente em torno do núcleo. Transformação gordurosa: vacúolos e cistos gordurosos.	3	Estágio avançado e/ou áreas extensas acometidas (mais de 50% da área da secção na lâmina).
		0	Ausentes.
		1	Estágio inicial e/ou áreas pequenas acometidas (até 20% da área da secção na lâmina).
Necrose	Conjunto de alterações morfológicas que ocorrem após a morte de células num tecido ou órgão vivo. Alterações citoplasmáticas: eosinofilia, maior densidade óptica, tumefação e vacuolação do citoplasma, e calcificação. Alterações nucleares: picnose, cariorrexe, cariólise, e ausência de núcleo. Tipos de necrose hepática: necrose de células isoladas, necrose focal, periacinar, peri-portal, paracentral, maciça.	2	Estágio intermediário e/ou áreas moderadas acometidas (20 a 50% da área da secção na lâmina).
		3	Estágio avançado e/ou extensas áreas acometidas (mais de 50% da área da secção na lâmina).
		0	Ausente.
		1	Estágio inicial e/ou pequenas áreas acometidas (até 20% da área da secção na lâmina).
		2	Estágio intermediário e/ou moderadas áreas acometidas (20 a 50% da área da secção na lâmina).
		3	Estágio avançado e/ou extensas áreas acometidas (mais de 50% da área da secção na lâmina).

conclusão

ALTERAÇÃO CELULAR	DESCRIÇÃO*	ESCORE	CARACTERÍSTICAS
Processos inflamatórios	Reação inflamatória aguda ou crônica. Inflamação aguda: exsudação de líquido e proteínas plasmáticas; emigração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Inflamação crônica: presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sangüíneos e tecido conjuntivo.	0	Ausentes ou sutis.
		1	Estágio inicial – poucas células inflamatórias em toda a secção e/ou processo focal.
		2	Estágio intermediário – moderada quantidade de células inflamatórias em toda a secção.
		3	Estágio avançado – muitas células inflamatórias em toda a secção.
Fibrose	Acúmulo de matriz extracelular em resposta a uma lesão aguda ou crônica.	0	Ausente
		1	Estágio inicial e/ou pequenas áreas acometidas (até 20% da área da secção na lâmina).
		2	Estágio intermediário e/ou moderadas áreas acometidas (20 a 50% da área da secção na lâmina).
		3	Estágio avançado e/ou extensas áreas acometidas (mais de 50% da área da secção na lâmina).
Hiperplasia de dutos biliares	Reação geral à injúria hepática.	0	Ausente.
		1	Estágio inicial - pequenas áreas acometidas (até 20% da área da secção na lâmina).
		2	Estágio intermediário - moderadas áreas acometidas (20 a 50% da área da secção na lâmina).
		3	Estágio avançado - extensas áreas acometidas (mais de 50% da área da secção na lâmina).
Neoplasia	Neoplasia hepática.	0	Presente
		3	Ausente

* NOTA: Adaptado de WERNER, P.R. **Patologia Geral Veterinária**, Edição 2005. Curitiba, PR. Apostila, 2005.

QUADRO 3 - SISTEMA DE GRADUAÇÃO PARA ANÁLISE HISTOPALÓGICA DE FÍGADO COM COLORAÇÃO AZUL DA PRÚSSIA OU PERL'S

ALTERAÇÃO CELULAR	DESCRIÇÃO	GRAU	CARACTERÍSTICAS
Depósito de ferro corado (hemossiderina e ferritina)	Siderose: depósito de ferro corado em azul. Consiste de micelas de ferritina e/ou grânulos de hemossiderina.	0	Ausente.
		1	Estágio inicial - pequena quantidade na lâmina. Pigmentos fracamente corados em hepatócitos, e pode haver depósitos em poucos macrófagos.
		2	Estágio intermediário - moderada quantidade na lâmina. Pigmentos corados em hepatócitos, e depósitos de vários tamanhos em macrófagos, formando grânulos (1 a 3 por campo em aumento 400x).
		3	Estágio avançado - grande quantidade na lâmina. Abundantes depósitos em hepatócitos e em macrófagos, formando muitos grânulos (mais de 3 por campo em aumento 400x).

3.3.6 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada no Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP), entre os meses de setembro e novembro de 2007.

As lâminas coradas em Azul da Prússia foram analisadas em microscópio ótico trinocular³ acoplado a um sistema de câmera digital⁴ e computador equipado com sistema para análise de imagens, sendo a captura de imagens feita em máquina fotográfica digital⁵. O programa de computador utilizado foi o Image Pro-Plus®⁶. O computador utilizado era dotado de processador Pentium 4®, Intel®, de 3.0 GHz de memória RAM e monitor de 19 polegadas⁷.

³ Olympus®, BX 50, Melville, NY, USA.

⁴ Evolution MP, 5.1 megapixels, Media Cybernetics®, Silver Springs, MD, USA.

⁵ Media Cybernetics Evolution MP – colors, Media Cybernetics®, Silver Springs, MD, USA.

⁶ Versão 5.1 for Windows, Media Cybernetics®, Bethesda, MD, USA.

⁷ Modelo L1950HQ-SN, LG Eletrônicos® de 19 polegadas.

Foi realizada análise morfométrica semiquantitativa, sendo a unidade de medida estabelecida nesse estudo a *Taxa de Siderose Hepática* (TSH), que é a área média percentual de parênquima hepático ocupada por depósitos de ferro em hemossiderina e ferritina corados com Azul da Prússia. A calibração do programa para análise histomorfométrica e a captura de imagens foram feitas com objetiva 40x e ocular 10x (aumento de 400x). Foram tomadas oito imagens por caso para a análise morfométrica, sendo a TSH a média aritmética e o desvio padrão.

O procedimento adotado para se obter de forma aleatória oito campos para mensuração morfométrica é apresentado a seguir: 1) Transformar a figura irregular da seção histológica em um polígono regular; 2) Traçar bissetrizes para definir o centro do polígono; 3) Marcar na lamínula o centro da figura com caneta de tinta à base de água; 4) Focar no microscópio o centro do polígono e adotá-lo como centro de um quadrado imaginário de 200 μ m de lado; 5) Com a ajuda de régua micrométrica no microscópio, estabelecer os vértices e os pontos médios de cada lado do quadrado como sendo os campos a serem fotografados para a mensuração dos depósitos de hemossiderina/ ferritina. Se qualquer um dos campos ficar fora da seção histológica ou em área parcialmente ou totalmente desprovida de parênquima hepático, um novo campo deve ser definido aleatoriamente em local próximo ao campo considerado inadequado; 6) Fotografar as oito imagens de cada caso e salvá-las no disco rígido do computador para posterior análise histomorfométrica.

Os procedimentos de mensuração das áreas com depósito de ferro são descrito a seguir: 1) A imagem desejada para análise morfométrica é exibida na tela do computador; 2) O ponteiro do *mouse*⁸ é utilizado para selecionar as áreas com tonalidades de azul representativas dos depósitos de hemossiderina/ ferritina, e com um clique no botão esquerdo do *mouse* as áreas são marcadas. Pode-se utilizar o recurso *zoom* para melhor visualizar as áreas a serem selecionadas; 3) Na barra de ferramentas utiliza-se a ferramenta Medir (*Measure*) para criar uma nova moldura da imagem em preto e branco, passando a ficar com a cor branca a área selecionada com depósitos de hemossiderina/ ferritina; 4) Utilizando-se a mesma ferramenta *Measure*, faz-se a medição automática da área branca da nova imagem, gerando um valor absoluto entre zero e um (Figura 10); 5) Os valores das oito imagens (campos)

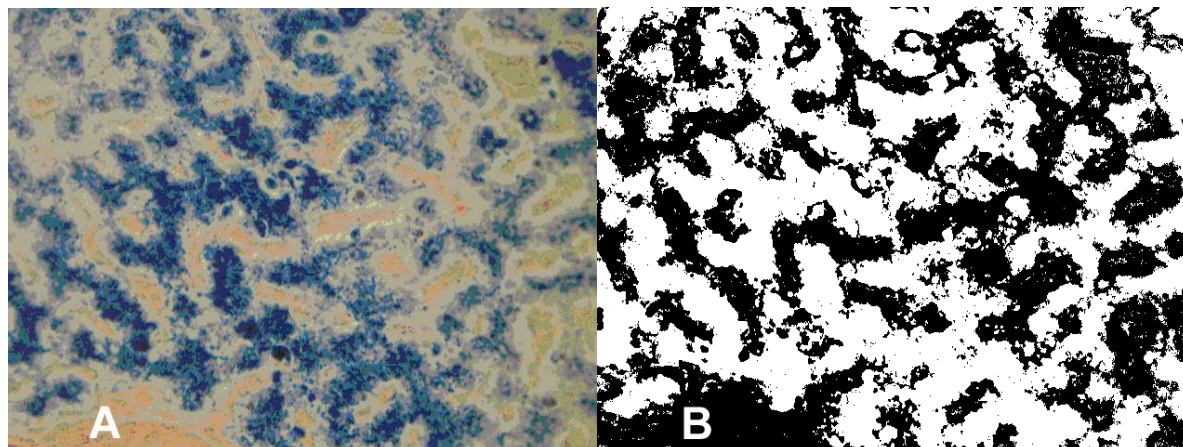
⁸ Mouse óptico Logitech®, mod. MX310.

são transferidos do programa Image Pro Plus® 5.1 para um programa de planilha⁹ para se obter a soma, a média aritmética e o desvio padrão do caso. Os valores absolutos são então transformados em valores percentuais para a obtenção da *Taxa de Siderose Hepática* (TSH).

Seções histológicas com cortes fragmentados não foram submetidas à análise histomorfométrica por gerar TSH com valores inferiores ao real. Por 'corte fragmentado' compreende-se as rupturas que ocorrem na secção histológica impregnada em parafina, formando falhas (espaços vazios) na secção, que tornam a análise morfométrica imprecisa.

⁹ Excel®, Microsoft, Redmond, Washington, USA.

FIGURA 10 – (A) Fotomicrografia de fígado de tucano-toco (*Ramphastos toco*) com depósitos de hemossiderina (corados em azul). Coloração Azul da Prússia. (B) Mesma imagem convertida para preto e branco pelo programa Image Pro Plus 5.1. As áreas brancas foram as selecionadas como depósitos de hemossiderina e serão mensuradas pelo programa de computador para gerar a Taxa de Siderose Hepática. Magnificação: 400x.



3.3.7 Análise epidemiológica

A prevalência pode ser definida com o número de animais afetados e é o quociente do número de indivíduos doentes em um determinado ponto no tempo pelo número de indivíduos na população em risco naquele determinado ponto no tempo (THRUSHFIELD, 2004).

Para o cálculo da prevalência da sobrecarga hepática por ferro estabeleceu-se antes o limite de normalidade da TSH para a população estudada. Para isso, utilizou-se a TSH das aves de vida livre que permaneceram em cativeiro por um período máximo de dois meses (classe < 2 meses), pois se considerou essa classe a que mais bem representa o estado fisiológico do fígado de ranfastídeos em condição natural.

Para o cálculo do “Limite de Normalidade” da TSH da população estudada, aqui denominado “N”, utilizou-se a média aritmética (μ) e desvio padrão (s) da TSH das aves de vida livre que ficaram menos de dois meses em cativeiro (classe < 2 meses) e considerou-se o intervalo de confiança de 95% de distribuição na curva normal. Assim, a fórmula de cálculo estabelecida foi: $N = \mu \pm 1,96 \times s$.

Como a hemocromatose é caracterizada por sobrecarga hepática por ferro associada a lesões hepáticas expressivas, a prevalência da doença na população amostrada foi estabelecida a partir do número de casos que apresentaram essas duas condições de forma concorrente. Para o cálculo da prevalência da hemocromatose foi utilizado o escore acumulado para lesões hepáticas de grau moderado a severo (escore acima de “3”).

3.3.8 Análise estatística

Os dados estão apresentados no texto como média \pm desvio padrão. Já nos gráficos optou-se pelo emprego da média \pm erro padrão. Utilizou-se o Teste Exato de Fisher para comparar todas as variáveis, proporções ou porcentagens. Utilizou-se a correlação linear simples para avaliar a existência de associação entre características quantitativas. Optou-se por relatar o coeficiente de correlação (r), uma medida da intensidade de associação entre duas variáveis. Utilizou-se um programa de estatística¹⁰ e o site SISA - *Simple Interactive Statistical Analysis* (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/fishrhlp.htm>) para os testes estatísticos.

3.3.9 Redação e editoração

A redação e editoração da dissertação seguiram normas e orientações da Universidade Federal do Paraná (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2002a, b).

¹⁰ StatView for Windows 5.0, SAS Institute, NC, USA.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Relativos às amostras

As análises feitas em relação às amostras foram número de casos e idade das aves, período da coleta de material, espécies, sexo e origem do material biológico.

3.4.1.1 Número de casos e idade das aves

A amostragem consistiu de 69 casos. Vinte e sete (39%) casos apresentaram estágio moderado (escore “2”) ou avançado (escore “3”) de autólise e, por isso, não serviram para análise histopatológica, ou foram analisadas parcialmente. Contudo, tais amostras puderam ser avaliadas quanto ao grau de siderose. Onze (16%) amostras apresentaram estágio moderado ou avançado de fragmentação de corte, sendo que quatro (5,8%) não foram submetidas à análise morfométrica.

A idade das aves foi informada em 17 (24,6%) casos e variou de um mês a 16 anos e 10 meses. A distribuição de casos por faixa etária foi 2 (até 3 meses), 6 (1 – 3 anos), 2 (4 – 5 anos), 4 (8 – 10 anos) e 3 (11 – 17 anos).

3.4.1.2 Período de coleta de material biológico

O ano de realização das necropsias e coleta das amostras histológicas foi julho de 1991 a junho de 2007 (Quadro 4).

QUADRO 4 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS CONFORME O ANO DE COLETA

ANO	Nº DE CASOS	ANO	Nº DE CASOS
1991	1	2001	2
1992	2	2002	3
1993	5	2003	3
1994	5	2004	3
1996	4	2005	8
1997	4	2006	4
1998	1	2007	6
2000	4		
TOTAL			55

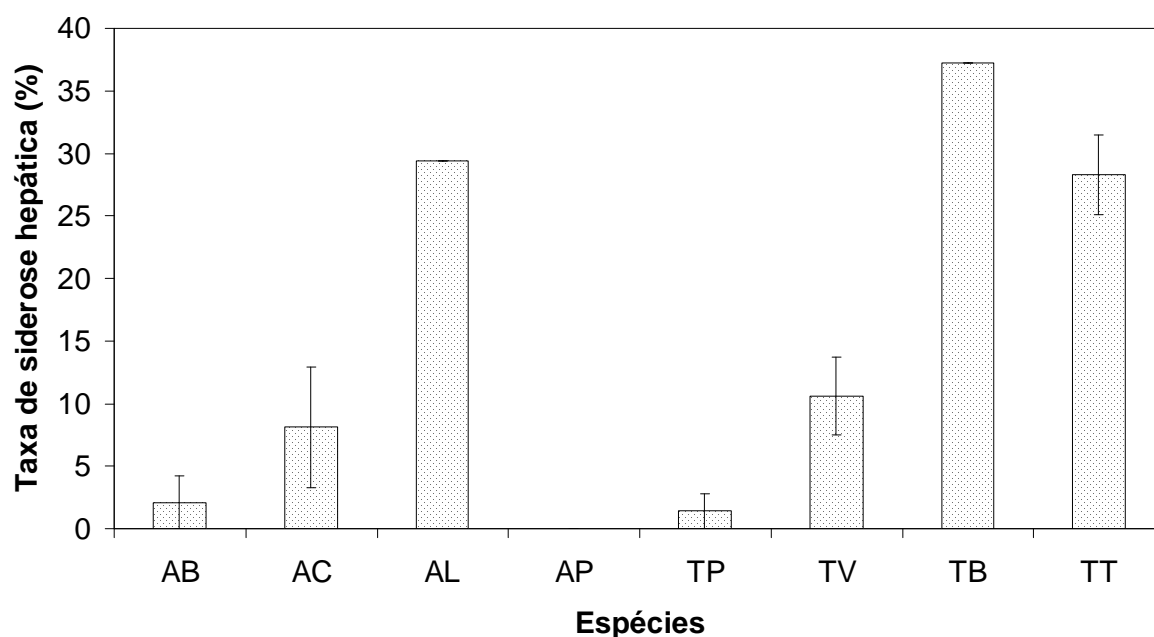
3.4.1.3 Espécies

Houve variação significativa na correlação entre espécies e a Taxa de Siderose Hepática TSH ($P = 0,019$). A TSH em tucano-toco (*Ramphastos toco*) [$28,3 \pm 20,7\%$] foi significativamente maior que em tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*) [$10,6 \pm 9,8\%$], $P = 0,007$. Em razão do pequeno número de amostras nas outras espécies (menos que dez indivíduos por espécie), não foram consideradas análises de comparação estatística, apenas uma análise descritiva das mesmas (Tabela 1 e Figura 11).

TABELA 1 - CORRELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA

NOME VULGAR	NOME CIENTÍFICO	Nº DE CASOS	TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA	
			MEDIA (%)	DESVIO PADRÃO (%)
Araçari-banana	<i>Bailloni</i>	2	2,1	3
Araçari-castanho	<i>Pteroglossus castanotis</i>	3	8,1	8,4
Araçari-de-letra	<i>Pteroglossus inscriptus</i>	1	29,4	-
Araçari-poca	<i>Selenidera maculirostris</i>	2	0	0
Tucano-de-bico-preto	<i>Ramphastos vitellinus</i>	2	1,4	2
Tucano-de-bico-verde	<i>Ramphastos dicolorus</i>	10	10,6	9,8
Tucano-de-papo-branco	<i>Ramphastos tucanus</i>	1	37,2	-
Tucano-toco	<i>Ramphastos toco</i>	46	28,3	20,7
Tucano	<i>Ramphastos sp</i>	2	10	2,3
TOTAL		69		

FIGURA 11 – CORRELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES E TAXA DE SIEROSE HEPÁTICA



NOTA: Abreviaturas dos nomes vulgares.

AB: Araçari-banana

AC: Araçari-castanho

AL: Araçari-de-letra

AP: Araçari-poca

TP: Tucano-de-bico-preto

TV: Tucano-de-bico-verde

TB: Tucano-de-papo-branco

TT: Tucano-toco

3.4.1.4 Sexo

Não houve variação significativa entre a TSH em machos ($22,9 \pm 21,4\%$) e em fêmeas ($21,5 \pm 19,1\%$), $P = 0,3$ (Tabela 2).

TABELA 2 - CORRELAÇÃO ENTRE GÊNERO E TAXA DE SIEROSE HEPÁTICA

SEXO	Nº DE CASOS	TAXA DE SIEROSE HEPÁTICA	
		MÉDIA (%)	DESVIO PADRÃO (%)
Macho	22	22,9	21,4
Fêmea	27	21,5	19,1
TOTAL	49		

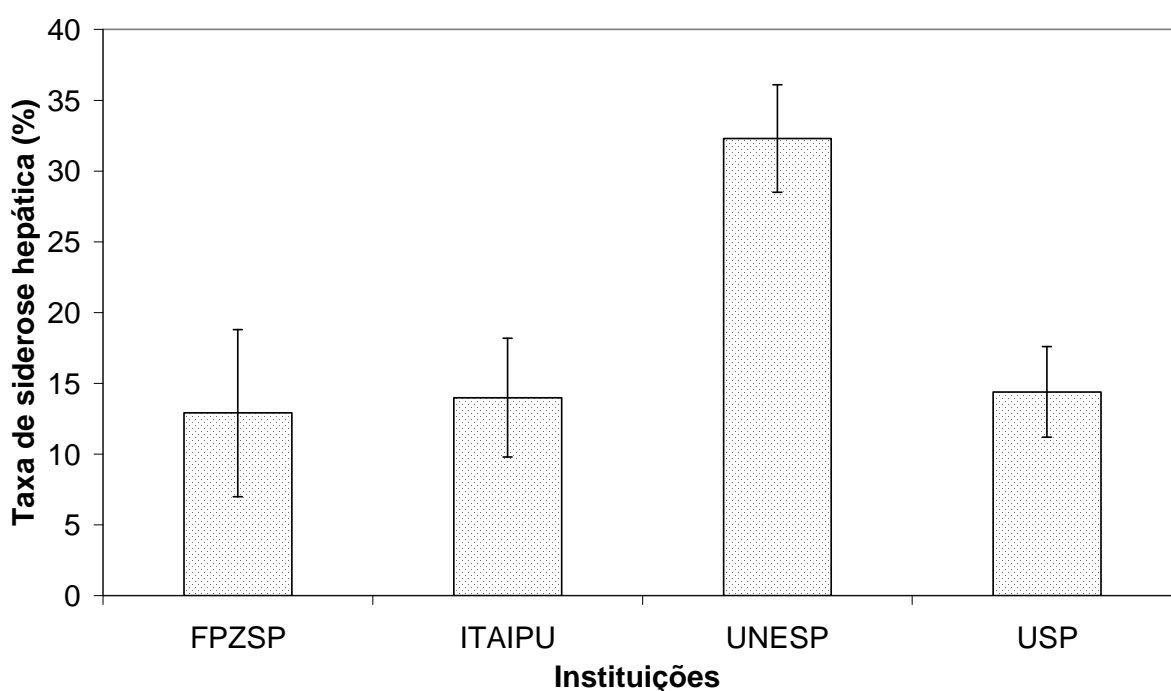
3.4.1.5 Origem das amostras biológicas

Houve variação significativa na correlação entre a origem dos casos e a TSH ($P = 0,002$). Os casos da UNESP ($32,3 \pm 20,1\%$) apresentaram TSH significativamente maior que os casos da FPZSP ($12,9 \pm 21,3\%$), $P = 0,002$, ITAIPU ($14 \pm 13,2\%$), $P = 0,008$, e USP ($14,4 \pm 12,2\%$), $P = 0,004$ (Tabela 3 e Figura 12).

TABELA 3 - CORRELAÇÃO ENTRE ORIGEM DOS CASOS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA

INSTITUIÇÃO	Nº DE CASOS	TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA	
		MÉDIA (%)	DESVIO PADRÃO (%)
FPZSP	13	12,9	21,3
ITAIPU	10	14	13,2
UNESP	28	32,3	20,1
USP	14	14,4	12,2
TOTAL	65		

FIGURA 12 - CORRELAÇÃO ENTRE ORIGEM DOS CASOS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA



NOTA: Abreviaturas e nomes das instituições colaboradoras.

FPZSP: Fundação Parque Zoológico de São Paulo

ITAIPU: Itaipu Binacional

UNESP: Universidade Estadual Paulista

USP: Universidade de São Paulo

3.4.2 Relativos aos métodos

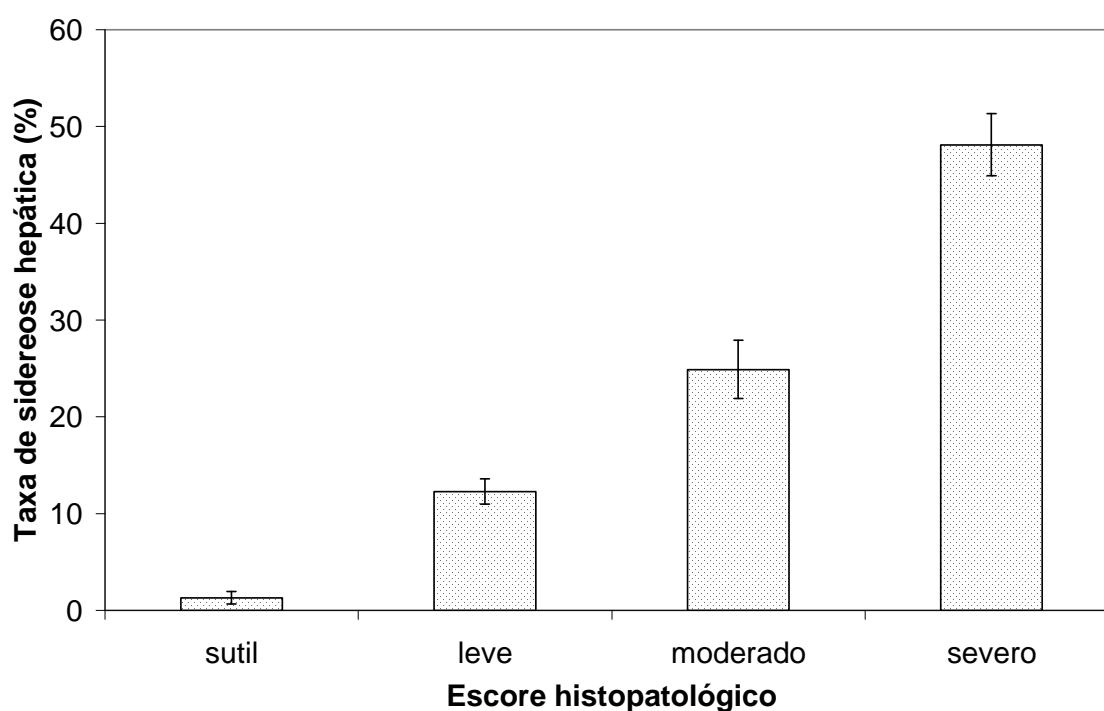
3.4.2.1 Correlação entre os métodos

Há uma correlação positiva muito forte entre os métodos de análise histopatológica (escores) e morfométrica (TSH), sendo $r = 0,99$ e o coeficiente de relação $P = 0,004$ significativa (Quadro 5 e Figura 13).

QUADRO 5 - DISTRIBUIÇÃO DE CASOS CONFORME ESCORES PARA SIDEROSE HEPÁTICA E RESPECTIVAS TAXAS DE SIDEROSE HEPÁTICA

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA Escore para siderose hepática			ANÁLISE MORFOMÉTRICA Taxa de siderose hepática	
Escore	Grau	Nº de amostras	Média (%)	Desvio Padrão (%)
0	Ausente ou sutil	13	1,3	2,4
1	Leve	25	12,3	6,5
2	Moderado	9	24,9	9,2
3	Elevado	18	48,1	13,7
TOTAL		65		

FIGURA 13 - CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE HISTOPATOLÓGICO PARA SIDEROSE HEPÁTICA E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA



3.4.3 Relativos ao manejo animal

3.4.3.1 Sistema de criação

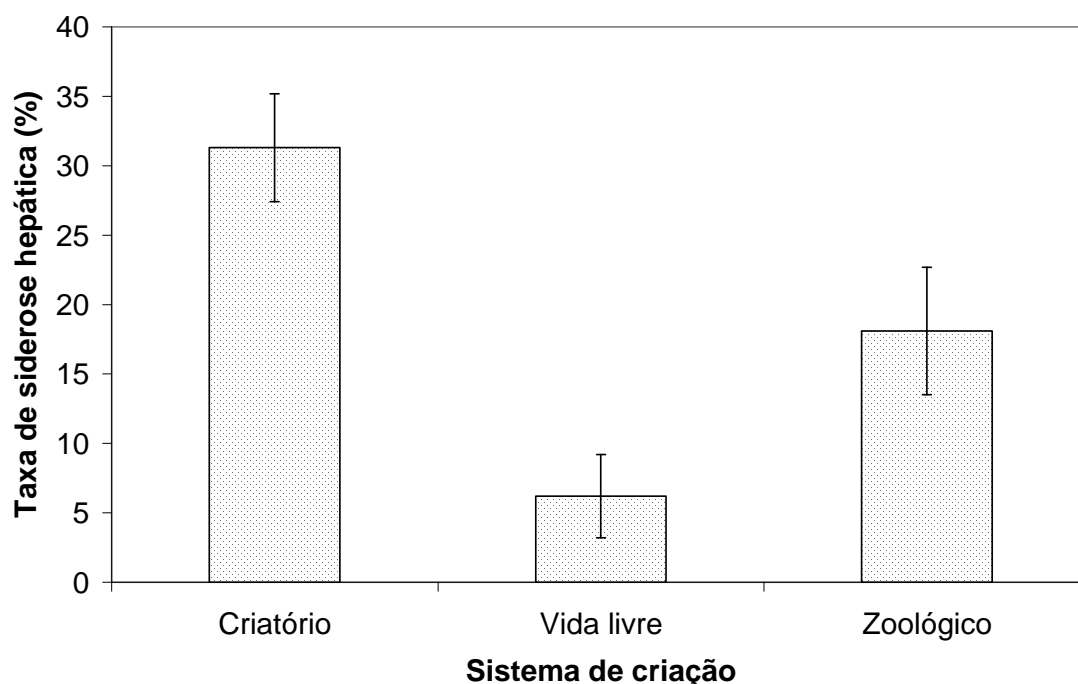
Houve variação significativa na correlação entre o sistema de criação e a TSH ($P = 0,008$). A TSH em aves oriundas de criatórios ($31,3 \pm 17,6\%$) foi significativamente maior que a TSH em aves de vida livre ($6,2 \pm 7,4\%$), $P = 0,005$, e de zoológicos ($18,1 \pm 21\%$), $P = 0,026$ (Tabela 4 e Figura 14).

As TSH dos casos provenientes da UNESP (Figura 12) e da espécie tucano-toco (*R. toco*) [Figura 11] foram substancialmente elevadas. Para determinar se a diferença estatística na correlação entre TSH e sistema de criação foi decorrente do fator aqui denominado 'casos da UNESP' (Quadro 6) ou se houve interferência do predomínio das amostras da espécie tucano-toco (*R. toco*), foi aplicado Teste Exato de Fisher e o resultado foi que não houve variação significativa da TSH nas amostras da espécie tucano-toco ($P = 0,17$) em relação a outras espécies nem nas amostras oriundas da UNESP ($P = 0,16$) em relação a outras instituições, indicando que estes fatores não interferiram de modo significativo na análise de correlação entre sistema de criação e TSH.

TABELA 4 - CORRELAÇÃO ENTRE SISTEMA DE CRIAÇÃO E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA

SISTEMA	Nº DE CASOS	TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA	
		MÉDIA (%)	DESVIO PADRÃO (%)
Criatório	22	31,3	17,6
Vida livre	6	6,2	7,4
Zoológico	22	18,1	21
TOTAL	50		

FIGURA 14 - CORRELAÇÃO ENTRE SISTEMA DE CRIAÇÃO E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA



QUADRO 6 - DISTRIBUIÇÃO DE CASOS POR SISTEMA DE CRIAÇÃO EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS DA ESPÉCIE TUCANO-TOCO E CASOS ORIGINÁRIOS DA UNESP

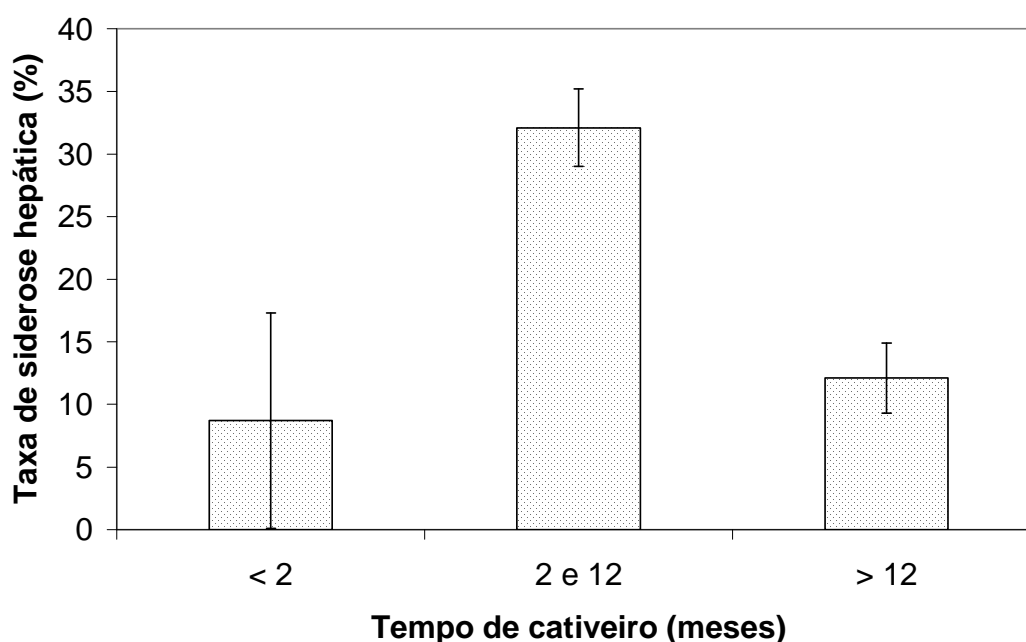
SISTEMAS	NÚMERO DE CASOS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO)			
	Tucano-toco	Outras espécies	UNESP	Outras instituições
Criatórios	17	3	15	5
Zoológicos	13	7	12	8
SOMA	30 (31,9 ± 21,3)	10 (12,3 ± 12,9)	27 (31,4 ± 20)	13 (17,9 ± 21,5)

3.4.3.2 Tempo de cativeiro

Houve variação significativa na correlação entre tempo de cativeiro e TSH ($P = 0,005$). A TSH em aves mantidas em cativeiro por período entre dois e 12 meses ($32,1 \pm 19,3\%$) foi significativamente maior que em aves mantidas em cativeiro por período inferior a dois meses ($8,7 \pm 9,3\%$) [$P = 0,005$] e por período superior a 12 meses ($12,1 \pm 11,1\%$), $P < 0,05$ (Tabela 5 e Figura 15).

TABELA 5 - CORRELAÇÃO ENTRE TEMPO DE CATIVEIRO E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA

TEMPO DE CATIVEIRO (MESES)	Nº DE CASOS	TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA	
		MÉDIA (%)	DESVIO PADRÃO (%)
< 2	9	8,7	9,3
2 a 12	5	32,1	19,3
> 12	18	12,1	11,1
TOTAL	32		

FIGURA 15 - CORRELAÇÃO ENTRE TEMPO DE CATIVEIRO E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA

3.4.4 Relativos à Patologia

3.4.4.1 Causas de morte

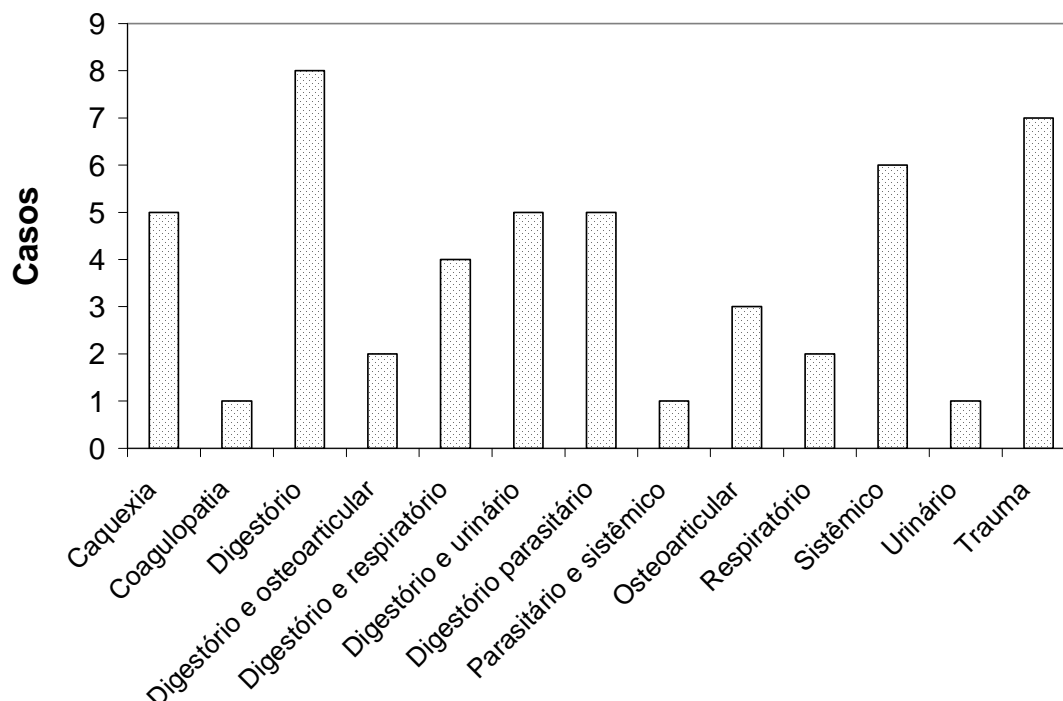
As instituições colaboradoras informaram a *causa mortis* em 50 casos. As causas de morte foram agrupadas em 13 classes, conforme os sistemas acometidos ou causas específicas. Seis classes são relativas a processos mórbidos no aparelho digestório e inclui, de forma indefinida, tanto processos infecciosos e parasitários como não infecciosos. Vinte e cinco casos (50%) tiveram a *causa mortis* relacionada a algum tipo de doença no aparelho digestório. Destes, oito (16%) casos foram

atribuídos a doença restrita ao aparelho digestório e 17 (34%) a doenças que acometem o aparelho digestório e outros sistemas conjuntamente (Quadro 7 e Figura 16). As doenças hepáticas foram atribuídas como *causa mortis* em 19 (38%) casos e a hemocromatose foi reconhecida em 12 (24%) casos. Outros termos utilizados pelos médicos veterinários das instituições colaboradoras para descrever doenças hepáticas nas necropsias foram hepatite, insuficiência hepática e hepatopatia.

QUADRO 7 - DISTRIBUIÇÃO DE CASOS CONFORME A CAUSA MORTIS E SISTEMA ACOMETIDO

CAUSA MORTIS/SISTEMA ACOMETIDO	Nº DE CASOS	Nº DE CASOS (%)
Aparelho digestório	8	16
Aparelho digestório e osteoarticular	2	4
Aparelho digestório e respiratório	4	8
Aparelho digestório e urinário	5	10
Aparelho digestório parasitário	5	10
Aparelho digestório parasitário e processo sistêmico	1	2
Aparelho respiratório	2	4
Aparelho urinário	1	2
Caquexia	5	10
Coagulopatia	1	2
Doenças sistêmicas	6	12
Sistema osteoarticular	3	6
Traumatismo	7	14
TOTAL	50	

FIGURA 16 - DISTRIBUIÇÃO DE CASOS CONFORME A CAUSA MORTIS E SISTEMA ACOMETIDO



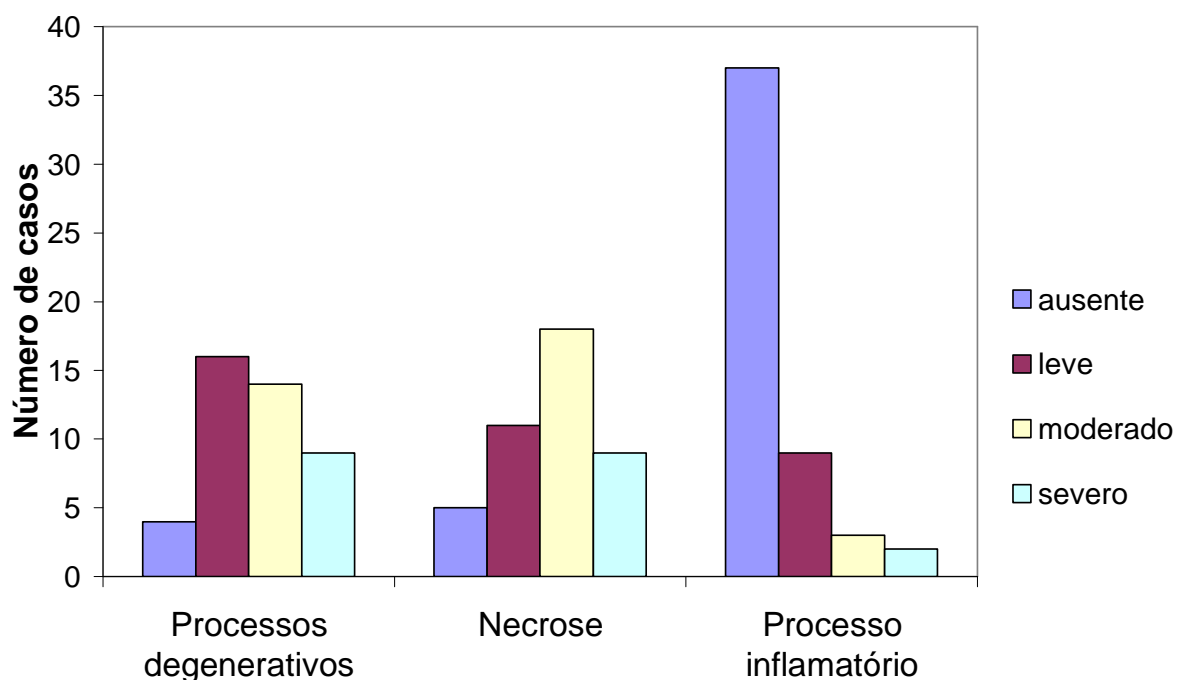
3.4.4.2 Lesões hepáticas

As lesões hepáticas (de grau moderado a severo) e suas respectivas ocorrências percentuais foram: processos degenerativos (53,5%), necrose (62,8%) e processos inflamatórios (9,8%). Não houve casos de fibrose de grau moderado a severo. No Quadro 8 e na Figura 17 é apresentada a distribuição de casos conforme o grau das lesões hepáticas.

QUADRO 8 - DISTRIBUIÇÃO DE CASOS CONFORME GRAU DAS LESÕES HEPÁTICAS

Escore	Grau	Processos degenerativos	Necrose	Processos inflamatórios	Fibrose
0	Ausente ou sutil	4	5	37	49
1	Leve	16	11	9	2
2	Moderada	14	18	3	0
3	Severa	9	9	2	0
TOTAL		43	43	51	51

FIGURA 16 - DISTRIBUIÇÃO DE CASOS CONFORME GRAU DAS LESÕES HEPÁTICAS



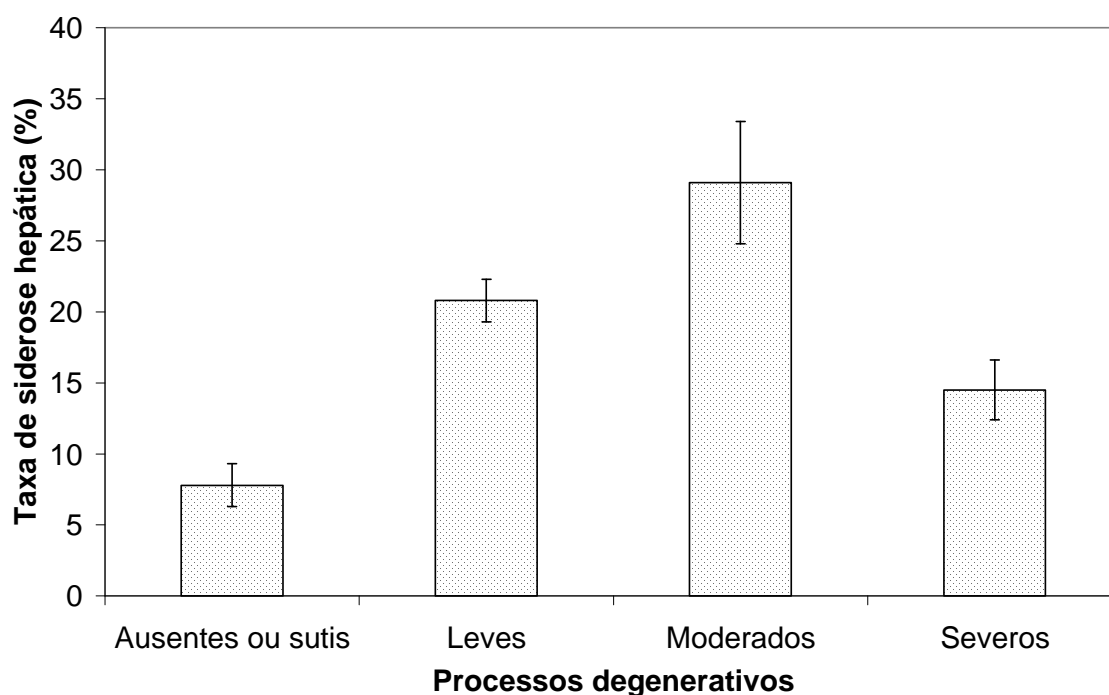
3.4.4.3 Processos degenerativos

Não houve diferença significativa na correlação entre grau de processos degenerativos e TSH ($P = 0,18$) [Tabela 6 e Figura 18]. O grau de correlação linear simples não foi significativo para processos degenerativos e TSH ($r = 0,4$), $P = 0,59$.

TABELA 6 - CORRELAÇÃO ENTRE PROCESSOS DEGENERATIVOS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA

Escore	ANÁLISE HISTOPALÓGICA		ANÁLISE MORFOMÉTRICA	
	Grau	Nº de casos	Média (%)	Desvio Padrão (%)
0	Ausente a sutil	4	7,8	2,9
1	Leve	16	20,8	20,3
2	Moderada	14	29,1	23
3	Severa	9	14,5	16,1
TOTAL		43		

FIGURA 17 - CORRELAÇÃO ENTRE PROCESSOS DEGENERATIVOS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA

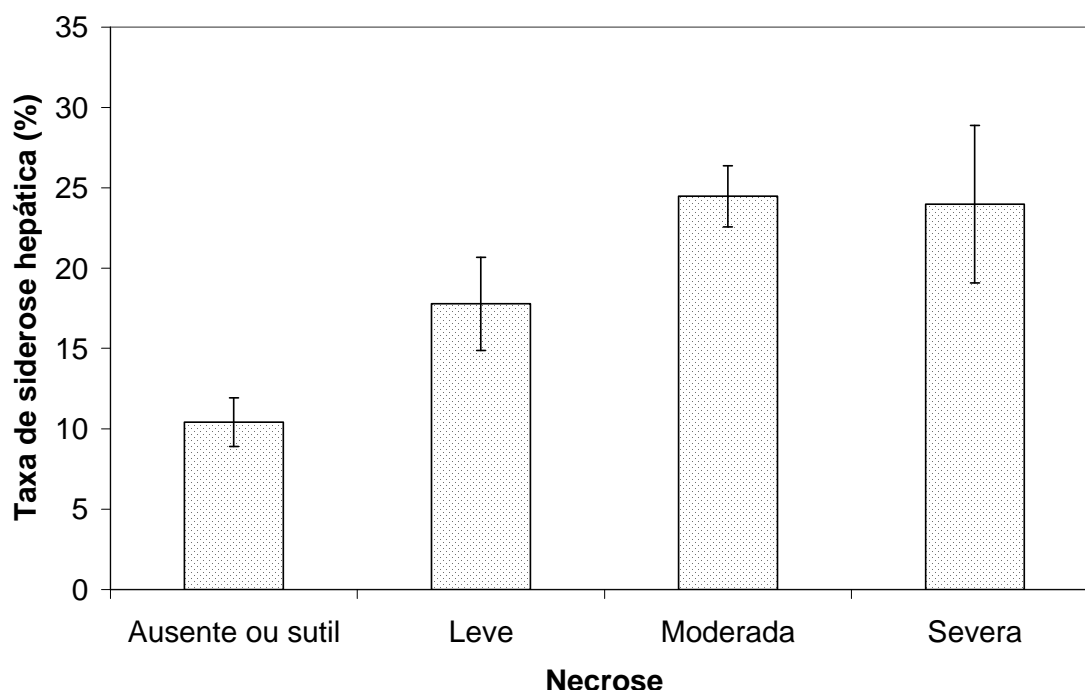


3.4.4.4 Necrose

Não houve diferença significativa na correlação entre grau de necrose hepática e TSH ($P = 0,51$) [Tabela 7 e Figura 19]. O grau de correlação linear simples foi muito forte para grau de necrose e TSH no que tange ao valor de ' r ' ($r = 0,93$) e houve significância para esse coeficiente quando o nível de significância é de 93% ($P = 0,07$).

TABELA 7 - CORRELAÇÃO ENTRE NECROSE E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA			ANÁLISE MORFOMÉTRICA	
Escore	Grau	Nº de casos	Média (%)	Desvio Padrão (%)
0	Ausente ou sutil	05	10,4	8,2
1	Leve	11	17,8	20,8
2	Moderada	18	24,5	20,6
3	Severa	09	24	23,6
TOTAL		43		

FIGURA 19 - CORRELAÇÃO ENTRE NECROSE E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA

3.4.4.5 Processo inflamatório

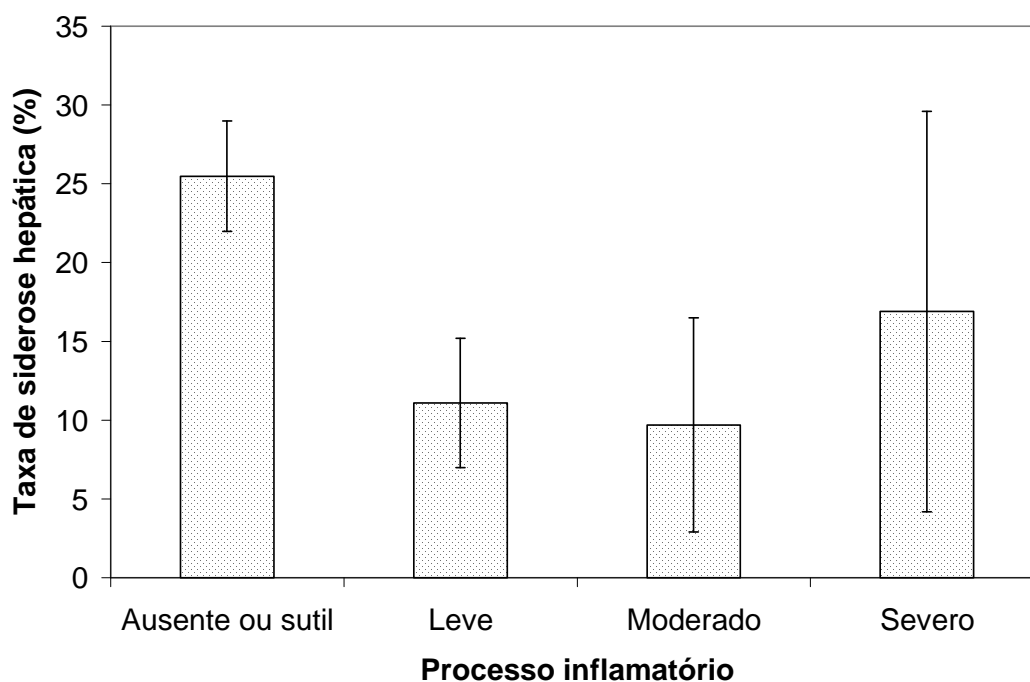
Não houve diferença significativa na correlação entre grau de processo inflamatório e TSH ($P = 0,38$) [Tabela 8 e Figura 20].

Houve correlação negativa forte entre processo inflamatório e TSH ($r = -0,62$), sem significância para o coeficiente 'r' ($P = 0,37$).

TABELA 8 - CORRELAÇÃO ENTRE PROCESSO INFLAMATÓRIO E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA

ANÁLISE HISTOLÓGICA			ANÁLISE MORFOMÉTRICA	
Escore	Grau	Nº de casos	Média (%)	Desvio Padrão (%)
0	Ausente ou sutil	37	25,5	21,3
1	Leve	9	15,8	17,8
2	Moderado	3	9,7	11,9
3	Severo	2	17	18
TOTAL		51		

FIGURA 20 - CORRELAÇÃO ENTRE PROCESSO INFLAMATÓRIO E TAXA DE SIEROSE HEPÁTICA



3.4.4.6 Fibrose

De 51 amostras examinadas com a coloração Hematoxilina e Eosina, apenas duas apresentaram fibrose “leve” (escore 1) e a TSH para as duas amostras foi $31,9 \pm 32,4\%$.

Das dez amostras examinadas com a coloração Tricrômio de Masson, nenhuma apresentou fibrose.

3.4.4.7 Hiperplasia de dutos biliares e neoplasia

Nenhuma amostra apresentou hiperplasia de dutos biliares nem neoplasia.

3.4.4.8 Escore acumulado para lesões hepáticas

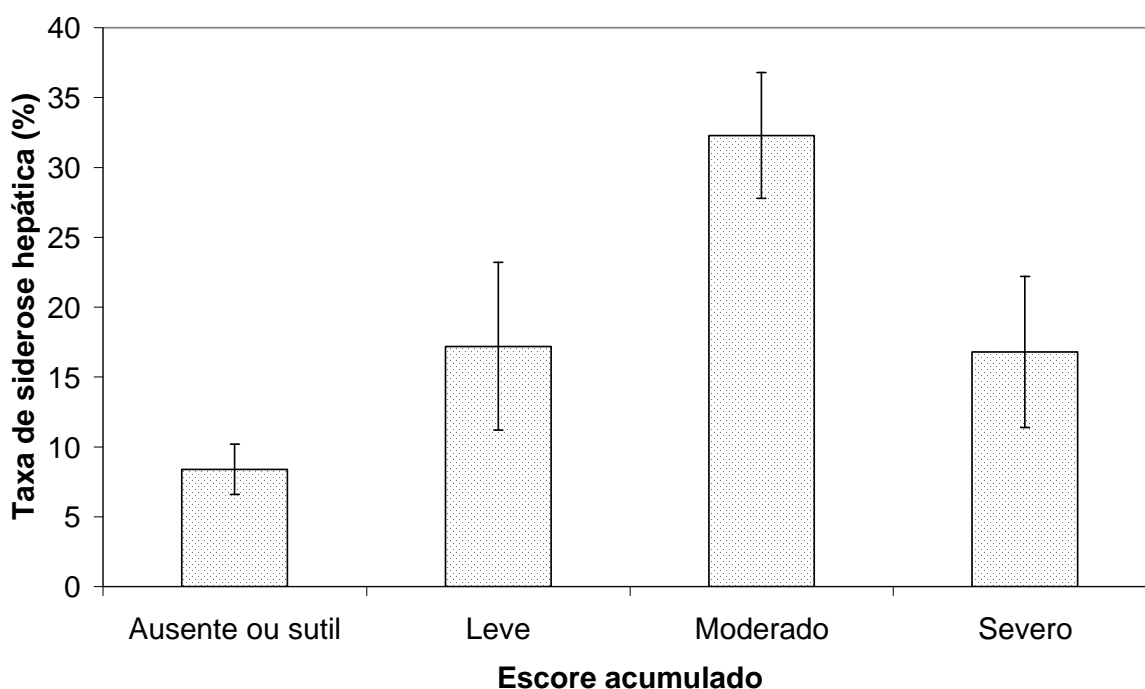
O escore acumulado para lesões hepáticas (processos degenerativos, necrose, processo inflamatório e fibrose) compreendeu escores de zero a nove (Tabela 9 e Figura 21). Houve variação significativa na correlação entre escore acumulado e TSH para nível de significância de 6% ($P = 0,06$).

A correlação linear simples entre escore acumulado e TSH foi positiva ($r = 0,52$), todavia, sem significância para este coeficiente ($P = 0,47$).

TABELA 9 - CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE ACUMULADO PARA LESÕES HEPÁTICAS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA			ANÁLISE MORFOMÉTRICA	
Escore acumulado	Grau	Nº de casos	Média (%)	Desvio Padrão (%)
0	Ausente ou sutil	3	8,4	3,2
1 e 2	Leve	12	17,2	21
3 e 4	Moderada	16	32,3	17,9
5 a 9	Severa	15	16,8	21,1
TOTAL		46		

FIGURA 21 - CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE ACUMULADO PARA LESÕES HEPÁTICAS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA



3.4.4.9 Agregados mononuclear-fagocíticos

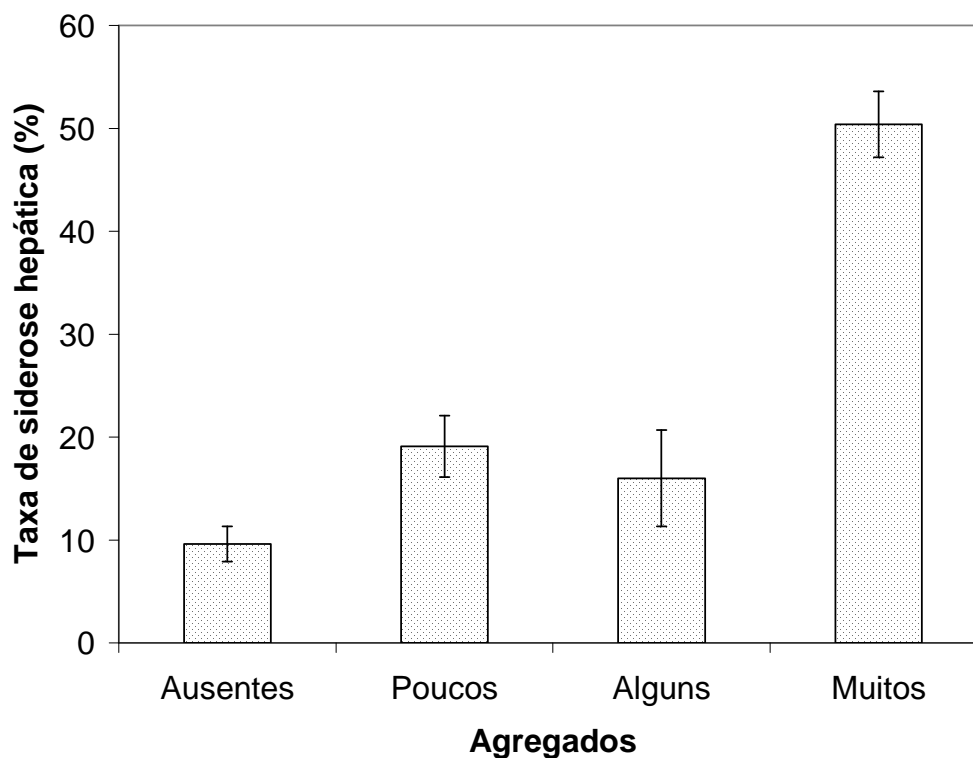
Houve diferença significativa na correlação entre quantidade de agregados mononuclear-fagocíticos e TSH ($P < 0,001$). A quantidade de agregados mononuclear-fagocíticos foi significativamente maior nas amostras de escore “1” ($19,1 \pm 9\%$) que nas de escore “0” ($9,5 \pm 9,4\%$) [$P = 0,022$]; e foi significativamente maior nas amostras de escore “3” ($50,4 \pm 12,7\%$) em relação às amostras de escores “0” ($9,5 \pm 9,4\%$), $P < 0,0001$; “1” ($19,1 \pm 9\%$), $P < 0,0001$; e “2” ($15,9 \pm 13,3\%$), $P < 0,0001$ (Tabela 10 e Figura 22).

Houve correlação positiva de grau forte entre quantidade de agregados mononuclear-fagocíticos e TSH ($r = 0,84$), porém, sem significância para o coeficiente de correlação ‘ r ’ ($P = 0,15$).

TABELA 10 - QUANTIDADE DE AGREGADOS MONONUCLEAR-FAGOCÍTICOS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA			ANÁLISE MORFOMÉTRICA	
Escore	Grau	Nº de casos	Média (%)	Desvio Padrão (%)
0	Ausentes	32	9,5	9,4
1	Poucos	9	19,1	9
2	Alguns	8	15,9	13,3
3	Muitos	16	50,4	12,7
		65		

FIGURA 22 - CORRELAÇÃO ENTRE AGREGADOS MONONUCLEAR-FAGOCÍTICOS E TAXA DE SIDEROSE HEPÁTICA



3.4.5 Relativos à epidemiologia

3.4.5.1 Prevalência da sobrecarga de ferro e da hemocromatose na população estudada

Para o cálculo do “Intervalo de Normalidade” (N) na amostra utilizou-se a TSH de seis aves de vida livre que ficaram menos de dois meses em cativeiro ($8,7\% \pm 9,3\%$) [Tabela 5]. Portanto: $N = \mu \pm 1,96 \times s \rightarrow N = 8,7 \pm 18,2 = 26,9\%$, ou seja, o limite superior do intervalo de normalidade da TSH para 95% dos casos normais é 26,9%.

De 65 casos submetidos à análise morfométrica, 20 (30,7%) tiveram TSH acima desse limite de normalidade, ou seja, a prevalência de sobrecarga hepática por ferro na população estudada foi 30,7%.

Dos 20 (30,7%) casos de sobrecarga de ferro na população amostrada, 15 foram submetidos à análise histopatológica. Destes, 13 (86,6%) casos tiveram escores acumulados superiores ou iguais a “3” (9 casos com lesões de grau moderado e 4 casos com lesões de grau severo). Portanto, a prevalência da hemocromatose na população estudada foi 26,6%.

3.5 DISCUSSÃO

Este estudo, que é a primeira análise retrospectiva de siderose hepática em aves da família Ramphastidae em cativeiro, indicou alta prevalência da sobrecarga de ferro e da hemocromatose na população amostrada, bem como alta ocorrência de doenças hepáticas como *causa mortis* de ranfastídeos. Acredita-se que os resultados obtidos na população amostrada são consistentes o suficiente para servirem como estimativa da prevalência da sobrecarga hepática e da hemocromatose em populações cativas de aves da família Ramphastidae no Brasil.

3.5.1 Relativa às amostras

Uma das características da população estudada foi sua heterogeneidade. As amostras foram obtidas de várias instituições, de aves com histórico de manejo diversificado, e mantidas em cativeiro em épocas distintas ao longo do período de estudo. Embora tenham sido apenas quatro as instituições colaboradoras, as amostras cedidas pelas duas instituições de ensino e pesquisa (UNESP e USP) são de aves que estavam em diversos zoológicos e criatórios do Brasil. Portanto, pode-se dizer que a população estudada foi representativa da população-alvo, ou seja, a população de tucanos e araçarís mortos em zoológicos e criatórios no Brasil no período de 1991 a 2007. O fato de haver nesse estudo instituições de apenas dois Estados brasileiros não inviabiliza a representatividade da amostra em relação à população-alvo.

Por ser um estudo retrospectivo, foi utilizado material biológico disponível em laboratórios de reconhecidas instituições de ensino e pesquisa e também de estabelecimentos mantenedores de fauna silvestre no Brasil, caracterizando uma

amostragem não probabilística. No intuito de se evitar vieses na amostragem, buscaram-se como instituições colaboradoras um zoológico, um criatório e duas instituições de ensino que prestam serviço veterinário e realizam análise histopatológica de forma rotineira a clientes ou instituições.

Como as amostras foram coletadas e conservadas com técnicas próprias de cada instituição, não houve uma uniformidade estrita e, por conseguinte, nem todos os casos puderam ser submetidos à análise histopatológica, em razão de autólise e fragmentação da secção histológica, o que deve ser levado em conta na interpretação dos resultados. Apesar de inservíveis para avaliação histopatológica, as amostras com certo grau de autólise puderam ser submetidas à análise histomorfométrica, uma vez que os depósitos de ferro parenquimais persistem no tecido hepático.

As regiões geográficas de origem das aves amostradas não eram conhecidas na maioria dos casos, sendo, portanto, uma informação não solicitada às instituições colaboradoras.

Fatores nutricionais e genéticos são reconhecidos como responsáveis pela sobrecarga de ferro e hemocromatose em aves (CORK, 2000; SHEPPARD e DIERENFELD, 2002; CUBAS, 2007). Por se tratar de estudo retrospectivo, não foi possível avaliar a influência dos níveis de ferro dietético em relação à Taxa de Siderose Hepática (TSH). A maioria dos casos não dispunha de histórico detalhado do manejo nutricional. Por não ser conhecida a composição da dieta das aves estudadas e as possíveis variações nas formulações e consumo dos alimentos ao longo do tempo, optou-se por não se realizar qualquer análise de correlação entre a TSH e níveis nutricionais de ferro.

Por ser o fígado o principal órgão de depósito de ferro no organismo e o primeiro a ser acometido pela hemocromatose (LOWESTINE e MUNSON, 1999; SCHMIDT et al., 2003; CUBAS, 2007), o estudo ficou restrito à análise do tecido hepático. Contudo, alterações histopatológicas em outros órgãos são também relevantes e merecem ser investigadas em pesquisas futuras.

Como nas aves os lóbulos hepáticos não são definidos por tecido conjuntivo e o parênquima aparece uniforme na microscopia óptica (SCHMIDT et al., 2003), a localização dos depósitos de hemossiderina em relação ao lóbulo hepático seria

imprecisa, optando-se por não especificar a localização das lesões e dos depósitos de hemossiderina.

A TSH foi significativamente maior em tucano-toco (*R. toco*) do que em tucano-de-bico-verde (*R. vitellinus*). Esse resultado pode ser atribuído à diferença no número de amostras de uma espécie para outra, sendo as amostras de tucano-toco quatro vezes e meia maior. Outra explicação para esse resultado estaria na origem das amostras. A maior parte (70%) dos tucanos-de-bico-verde (*R. vitellinus*) é oriunda de uma única instituição, a FPZSP (zoológico), que possivelmente os mantinha com dieta contendo baixo nível de ferro, pois a TSH para a maioria das aves dessa espécie foi baixa, embora fossem aves mantidas em cativeiro por período superior a 12 meses. Já os exemplares de tucano-toco são, em sua maioria (63%), originários da UNESP - instituição que presta atendimento veterinário e realiza análise necroscópica e histopatológica a outras entidades e criadores, ou seja, seus casos são de aves de tiveram origem e manejo nutricional variado. Como os casos originários da UNESP apresentaram TSH significativamente maior que os das outras instituições colaboradoras, esse fator poderia ter contribuído para a diferença da TSH entre as espécies mencionadas. Embora a hemocromatose seja descrita em várias espécies de ranfastídeos (WORELL, 1997) e até o momento não haja comprovação de que uma espécie desta família seja mais sensível que outra, o presente estudo indicou que o tucano-toco é a espécie mais acometida pela sobrecarga de ferro. Não foi possível, contudo, concluir se isso foi decorrente de características biológicas inerentes à espécie ou vieses na escolha da população estudada.

Não ocorreu diferença significativa na TSH entre machos e fêmeas. Tal resultado era esperado, pois diferentemente da mulher, que perde considerável quantidade de ferro pela hemorragia menstrual e pela gestação, e consequentemente manifesta menos a hemocromatose que o homem (SOUZA et al., 2001), nas aves parece não haver perda fisiológica de ferro tão significativa durante as fases reprodutivas.

A TSH significativamente maior nos casos pertencentes à UNESP pode ser atribuída ao fato de se tratar de uma instituição de ensino e pesquisa, que não mantém acervo próprio de aves silvestres, mas que presta serviços veterinários e de análise patológica a zoológicos e criadores. Por receber animais com doenças

crônicas, muitas vezes em estágio terminal, a probabilidade de morte e de se realizar necropsias em aves com sobrecarga de ferro parece ser muito maior nessa instituição. No entanto, a USP, que apresenta as mesmas características da UNESP quanto ao funcionamento como hospital veterinário e laboratório de patologia, teve a TSH significativamente menor (USP, $14,4 \pm 12,2\%$; UNESP, $32,3 \pm 20,1\%$), que pode ser atribuída ao menor número de casos em comparação à UNESP (UNESP 28; USP 14) ou a outros fatores não reconhecidos nesse estudo. As instituições FPZSP e ITAIPU apresentam características organizacionais semelhantes: a primeira é um zoológico e a outra é um criatório, portanto, ambas mantêm acervo próprio de aves. Como cada uma destas instituições mantém seus próprios sistemas de criação e manejo nutricional e mantêm equipe técnica especializada, esperava-se maior uniformidade no padrão de ocorrência da siderose hepática, o que realmente ocorreu, tendo sido observada TSH similar entre as duas instituições.

3.5.2 Relativa aos métodos

Utilizou-se como método de estudo a análise histopatológica, forma tradicional de diagnóstico da sobrecarga de ferro, e a análise histomorfométrica de imagens digitais. As duas técnicas demonstraram ser eficientes em classificar a siderose hepática, apresentando uma correlação muito forte e significativa pelo coeficiente de correlação simples.

A análise histológica permite não só caracterizar o grau de siderose, mas também diagnosticar e determinar a extensão de lesões celulares, tornando-a imprescindível no diagnóstico de doenças relacionadas à sobrecarga de ferro. Variações interobservadores, e até mesmo intra-observador têm sido documentadas, podendo haver discrepâncias de reprodutibilidade e discordância de até 60% entre patologistas experientes (STREFEZZI, 2007). Para reduzir as divergências de caráter subjetivo, foram estabelecidos neste estudo critérios para a graduação das alterações histológicas. Outro expediente para minimizar essas variações seria aumentar o número de observadores, os quais atuariam de forma independente, obtendo-se no final uma média das observações.

A análise histomorfométrica apresenta alta precisão e reprodutibilidade, sendo recurso útil na mensuração de área, forma e intensidade de cor na imagem digital. Em outros estudos, a análise computadorizada de imagens demonstrou significativa correlação com a dosagem bioquímica de ferro em tecido hepático, utilizando a técnica de espectrofotometria de absorção atômica (ORTEGA et al., 2005), o que valida a análise de imagens como método de diagnóstico da sobrecarga hepática por ferro também neste estudo. Outras vantagens da análise de imagem em relação ao método bioquímico é que a morfometria é realizada em material preparado rotineiramente para estudo histopatológico, portanto não requer despesas adicionais e permite estudos retrospectivos. Deve-se, contudo, estar atento para o fato de que a análise histomorfométrica é realizada por amostragem de campos microscópicos, e como a distribuição dos depósitos de hemossiderina não ocorre necessariamente de forma homogênea nas secções histológicas, pode haver considerável variação nos índices morfométricos. Isso se torna mais evidente quando se trabalha com número reduzido de amostra-campo. Como a análise morfométrica não é uma técnica completamente automatizada, pode haver interferência do observador/operador. Erros na seleção dos matizes de cores entre azul e cinza podem alterar o resultado final de medição na lâmina. Resíduos de corante Azul da Prússia, principalmente em tecido autolisado, podem ser indevidamente selecionados pelo observador, ampliando a área a ser mensurada, o que resulta em índice morfométrico erroneamente elevado. Neste estudo, optou-se pela simples mensuração da área de deposição de ferro corado com Azul da Prússia, não tendo sido utilizado o recurso de densidade óptica disponível no programa. Isso, por não ter havido padronização na obtenção, conservação e processamento do material analisado e também, variações na técnica de preparação dos cortes histológicos e da coloração poderiam alterar a espessura da seção e a intensidade da coloração, produzindo resultados pouco confiáveis. Além disso, não foi feita quantificação de ferro pelo método bioquímico, de modo que permitisse correlacionar diferentes matizes de cor com a quantidade de ferro presente no parênquima hepático, ou seja, estabelecer uma escala de correlação de cores para respectivas quantidades de ferro.

3.5.3 Relativa ao manejo animal

A TSH em aves de vida livre foi inferior à TSH em aves de cativeiro, tanto as de criatórios como as de zoológicos. Esse resultado era esperado, por ser rara a ocorrência de DSF em aves de vida livre, uma vez que na natureza consomem uma dieta ajustada às suas necessidades fisiológicas (WARD et al., 1988; DIERENFELD et al., 1994; LOWESTINE e MUNSON, 199; WHITESIDE, 2001).

A TSH em aves de criatórios foi significativamente maior que em aves de vida livre e de zoológico. A diferença na TSH entre criatórios e zoológicos pode ser atribuída ao desconhecimento dos criadores sobre princípios de nutrição animal. Até recentemente havia desconhecimento por parte dos criadores, e até mesmo por médicos veterinários não especialistas em aves silvestres, quanto às necessidades nutricionais de aves de espécies suscetíveis à sobrecarga de ferro. O uso de ração para cães, com altos níveis de ferro na matéria seca, era uma prática comum em criatórios até pouco tempo. Já em zoológicos brasileiros, grande parte dos médicos veterinários contratados em período integral, tem conhecimento da DSF e da necessidade dos Ramphastidae por dietas balanceadas, como forma de prevenção da doença. Apenas em anos recentes é que foram lançadas no mercado brasileiro rações com baixos níveis de ferro, próprias para aves de espécies suscetíveis à hemossiderose/ hemocromatose. Conforme demonstrado por análise estatística, não pode ser atribuída influência dos fatores espécie tucano-toco e 'casos da UNESP' no resultado da correlação entre sistema de criação e TSH (Quadro 5).

A baixa taxa de siderose em aves que morreram com menos de dois meses em cativeiro (< 2 meses) confirma as expectativas de que a sobrecarga de ferro e hemocromatose não ocorrem ou são raras em aves de vida livre. A maior parte dessas aves (5 de 8 casos) teve como *causa mortis* traumatismo, fator não relacionado a doenças hepáticas. A baixa (porém não nula) TSH em ranfastídeos com pouco tempo de cativeiro (< 2 meses) indica que aves de vida livre apresentam baixo grau de siderose hepática, que pode se alterar em períodos de maior oferta de alimento com alta biodisponibilidade de ferro, como por exemplo, quando há maior oferta de filhotes de pássaros que são predados nos ninhos. Outra explicação para a baixa (mas não nula) TSH em ranfastídeos com menos de dois meses em cativeiro,

é que o processo de deposição de ferro pode ocorrer de forma relativamente rápida, tão logo se inicie consumo de alimento com níveis excessivos de ferro. Para se estabelecer uma TSH mais representativa da condição fisiológica das aves de vida livre, recomenda-se um número maior de amostras e, preferencialmente, de aves que não tenham estado em cativeiro.

A alta TSH em aves mantidas em cativeiro por período compreendido entre dois e 12 meses pode ser viés da baixa quantidade de amostras ($n = 5$), ou da espécie tucano-toco (*R. toco*) ser a única representada nesta amostra. Porém, outra inferência pode ser a de que aves com alta TSH, e possivelmente com lesões hepáticas, morreram num prazo relativamente curto (de dois a 12 meses) em razão da sobrecarga por ferro - isso se levando em conta que a longevidade das espécies em cativeiro pode passar de 15 anos.

A TSH em aves com mais de 12 meses em cativeiro foi menor que a TSH das aves com dois a 12 meses de cativeiro. O que se pode deduzir desse resultado é que a menor TSH (e possivelmente menor comprometimento hepático) explicaria a maior longevidade dessas aves, muitas das quais viveram mais de oito anos em cativeiro. Porém, a confirmação dessa hipótese requer outras investigações que contemplem maior número de amostras. O presente estudo corrobora o trabalho de WARD et. al. (1988), que não encontraram correlação entre hemocromatose em espécies de aves frugívoras e insetívoras e idade, porém, difere daqueles autores, no que tange o tempo de cativeiro, pois nesse estudo houve diferença significativa entre TSH e tempo de cativeiro.

3.5.4 Relativa à Patologia

Os motivos dos óbitos relatados pelas instituições colaboradoras para 50 aves foram estabelecidos a partir de achados necroscópicos, e possivelmente microscópicos em alguns casos. A indicação de alterações hepáticas em 38% das necropsias revela alta ocorrência de doenças hepáticas em ranfastídeos cativos. Se desconsiderada a *causa mortis* por trauma (sete casos), que é um fator acidental, o percentual de casos com alterações hepáticas em necropsias se eleva para 44%.

A indicação de óbito por hemocromatose em 12 (24%) casos demonstra ser a doença causa comum de mortalidade nas populações *ex-situ* de aves da família Ramphastidae. Em 17 casos (34%), as doenças hepáticas estavam associadas a alterações mórbidas no próprio aparelho digestório ou em outro sistema. Se considerado o fato de que a insuficiência hepática crônica pode determinar debilidade orgânica e imunológica, é de se esperar que processos infecciosos e não infecciosos diagnosticados em outros sistemas, e aparentemente não relacionados com a sobrecarga de ferro, como por exemplo, endoparasitismo, sejam secundários à hemocromatose ou DSF. Isso poderia elevar ainda mais os índices percentuais das causas de morte em decorrência da DSF.

As lesões de grau moderado a severo mais freqüentes foram necrose (62,8%) e processos degenerativos (53,5%). Processos inflamatórios moderados a severos foram identificados em apenas 9,8% das amostras. Diferentemente do ser humano, em que é descrita a ocorrência de fibrose e cirrose hepática em estágios avançados da Hemocromatose Hereditária (SOUZA et al., 2001), não foi encontrada fibrose de grau significativo na população estudada. Também não foi encontrada hiperplasia de dutos biliares nem neoplasia.

Houve significância na correlação linear positiva entre necrose e TSH, indicando que a siderose hepática está associada à necrose hepática; possivelmente em decorrência de alterações circulatórias no fígado pelo acúmulo de hemossiderina, falhas da bomba de sódio e potássio, rompimento de membranas celulares dos hepatócitos e extravasamento de enzimas intracelulares.

O valor menor da TSH para grau severo em processos degenerativos e necrose pode ser atribuído a outras injúrias celulares mais agudas, como agentes infecciosos e toxinas, que poderiam causar lesões severas e o óbito, não estando relacionado ao grau de siderose.

De 51 casos analisados, 37 (72,5%) não apresentaram processo inflamatório, e para esses, a TSH ($25,5 \pm 21,3\%$) foi a maior, indicando que na população estudada não houve correlação entre sobrecarga de ferro e processo inflamatório.

A correlação significativa entre escores acumulados e TSH confirma a associação da siderose com lesões hepáticas. Como a análise de correlação dos escores acumulados e a TSH pode ser considerado mais abrangente que a análise de cada uma das lesões individualmente, o sistema de avaliação de lesões

hepáticas por variáveis categóricas, denominado escore acumulado, demonstrou ser útil na caracterização da hemocromatose das aves, podendo vir a ser empregado em pesquisas futuras que tratem da análise da integridade tecidual hepática.

Houve uma correlação positiva e significativa entre quantidade de agregados mononuclear-fagocítico e TSH, demonstrando que os macrófagos aumentam sua atividade fagocítica à medida que os depósitos de hemossiderina aumentam, possivelmente extravasados dos hepatócitos degenerados e necrosados, ou ainda, para remover da circulação ferro ligado a transferrina ou na forma livre. A presença de agregados mononuclear-fagocíticos caracteriza uma reação inflamatória inespecífica. Esses agregados são abundantes e podem se tornar relativamente grandes (em torno de 75µm), ocupando grandes extensões no corte histológico. A presença de agregados mononuclear-fagocíticos é compatível com o padrão de deposição de ferro da hemocromatose secundária no ser humano (FAIRBANKS, 1994; ANDREWS, 1999; WHITESIDE, 2001). Como a hemocromatose de ordem nutricional é uma doença classificada como secundária, esse padrão de deposição é indicativo da ingestão de níveis excessivos de ferro nas aves.

3.5.5 Relativa à Epidemiologia

A prevalência de sobrecarga hepática por ferro (30,7%) e da hemocromatose (26,6%) na população estudada apresentaram valores semelhantes aos de doenças hepáticas (38%) e hemocromatose (24%) estabelecidos nas necropsias. Esses índices confirmam a suspeita inicial de que a hemocromatose ou DSF é comum e representa importante causa de morte de aves da família Ramphastidae em populações *ex-situ* no Brasil. Além disso, o estudo indica que a doença é um importante fator de decréscimo dessas populações e pode ser fator de impedimento reprodutivo por afetar a função hepática. Baseado nesses conhecimentos, medidas preventivas devem ser adotadas nas instituições mantenedoras de ramfástídeos, as quais incluem um correto manejo nutricional, diagnóstico correto *ante* e *post-mortem*, e também medidas sanitárias na criação. Em relação à nutrição, os criadores devem oferecer dietas com baixos níveis de ferro e ácido ascórbico, alimentos com ferro de

baixa biodisponibilidade, com quelantes naturais (tanino) e antioxidantes (carotenóides e vitamina E) [McDONALD, 2003].

3.6 CONCLUSÕES

- Materiais biológicos processados rotineiramente para análise histopatológica possibilitam estudos retrospectivos de doenças que acometem aves silvestres.
- A análise histopatológica com sistema de gradação para siderose hepática apresentou alta correlação com a análise histomorfométrica de imagens digitais, demonstrando serem métodos complementares que possibilitam estudos com análises estatísticas.
- A espécie tucano-toco (*Ramphastos toco*) apresentou siderose hepática significativamente maior que a espécie tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*).
- Não houve variação significativa na taxa de siderose hepática entre macho e fêmea.
- Aves de vida livre que permaneceram menos de dois meses em cativeiro apresentaram taxa de siderose hepática significativamente menor que aves que permaneceram mais tempo em cativeiro, reforçando a idéia de que a sobrecarga hepática é rara ou talvez inexistente em ranfastídeos de vida livre.
- Aves oriundas de criatórios apresentaram taxa de siderose hepática significativamente maior que aves de zoológicos. Resultado atribuído ao desconhecimento dos criadores sobre a existência da hemocromatose e suas medidas preventivas, e também, ao fato dos criatórios terem menos assistência veterinária que os zoológicos.
- Os ranfastídeos que ficaram em cativeiro pelo período de dois a 12 meses apresentaram taxa de siderose hepática significativamente maior, indicando que aves que tiveram maior acúmulo de ferro hepático morreram em tempo relativamente curto, levando-se em conta a longevidade das espécies.
- Os ranfastídeos que sobreviveram em cativeiro por mais de 24 meses apresentaram taxa de siderose hepática significativamente menor, permitindo

inferir que aves com menor taxa de siderose hepática tendem a apresentar maior longevidade.

- Doenças hepáticas foram apontadas como *causa mortis* em 37% dos casos, normalmente associadas a doenças no aparelho digestório e/ou em outros sistemas, indicando comprometimento multissistêmico.
- A prevalência da sobrecarga hepática por ferro na população estudada foi 30,7% e da hemocromatose 26,6%, confirmando a suspeita inicial de que os casos de siderose hepática são comuns e contribuem de forma decisiva para a mortalidade de tucanos e araçarís em zoológicos e criatórios no Brasil.
- As lesões mais predominantes foram necrose (62,8%) e processos degenerativos (53,5%).
- Houve correlação significativa entre siderose hepática e lesões hepáticas, indicando que a siderose é acompanhada de lesões hepáticas significativas.
- Não houve casos de fibrose, cirrose e neoplasia hepática.
- Não houve correlação entre grau de siderose hepática e processos inflamatórios.
- Houve uma correlação positiva significativa entre agregados mononuclear-fagocíticos e grau de siderose hepática, indicando processo inflamatório inespecífico na siderose hepática.

3.7 REFERÊNCIAS

ANDREWS, N.C. Disorders of iron metabolism. **New England Journal of Medicine**, Waltham, MA, v.341, p.1986-1995, 1999.

BRAGA, J.A.P.; BARBOSA, T.N.N. Fisiologia e Metabolismo do Ferro, Capítulo 2. In: BRAGA, J.A.P.; AMANCIO, O.M.S.; VITALLE, M.S.S. **O Ferro e a Saúde das Populações**. São Paulo: Editora Roca, 2006, p.10-31.

BRAGA, J.A.P.; HOKAZONO, M. Sobrecarga de ferro. In: BRAGA, J.A.P.; AMANCIO, O.M.S.; VITALLE, M.S.S. **O Ferro e a Saúde das Populações**. São Paulo: Editora Roca, 2006, p.144-157.

CARCIOFI, A.C.; OLIVEIRA, L.D. Doenças Nutricionais. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora Roca, 2007, p.838-864.

COLLI, C. Biodisponibilidade de ferro. In: BRAGA, J.A.P.; AMANCIO, O.M.S.; VITALLE, M.S.S. **O Ferro e a Saúde das Populações**. São Paulo: Editora Roca, 2006, p.45-65.

CORK, S.C. Iron storage diseases in birds. **Avian Pathology**, v.29, p.7-12, 2000.

CORK, S.C.; ALLEY, M.R.; STOCKDALE, P.H.G. A quantitative assessment of haemosiderosis in wild and captive birds using image analysis. **Avian Pathology**, v.24, p.239-254, 1995.

CORNELISSEN, H.; DUCATELLE, R.; ROELS, S. Successful treatment of a channel-billed toucan (*Ramphastos vitellinus*) with iron storage disease by chelation therapy: sequential monitoring of the iron content of the liver during the treatment period by quantitative chemical and image analyses. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.9, p.131-137, 1995.

CORNELISSEN, H.; RITCHIE, B.W. Ramphastidae. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. (Ed.). **Avian Medicine: Principles and Application**. Lake Worth, FL: Wingers Publishing, Inc, 1994, p.1276-1283.

COSTA, A.L.M ; CATÃO-DIAS, J.L. Estudo morfológico da hemossiderose em aves silvestres. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.19, n.113, p.67-70, 2000.

CRISSEY, S.D.; WARD, A.M.; BLOCK, S.E.; MASLANKA, M.T. Hepatic iron accumulation over time in European starlings (*Sturnus vulgaris*) fed two levels of iron. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.31, n.4, p.491-496, 2000.

CUBAS, Z.S. Medicine: Family Ramphastidae (Toucans). In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. (Ed.). **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press, 2001, p.188-199.

CUBAS, Z.S. Piciformes (tucanos, araçaris, pica-paus). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora Roca, 2007, p.210-221.

CUBAS, Z.S. Piciformes (Woodpeckers, Barbets, Puffbirds, Jacamars, Toucans). In: FOWLER, M.E.; MILLER, R.E. **Zoo and Wild Animal Medicine**, 5th ed. St. Louis: Saunders, 2003, p.261-266.

CZIULIK, M. **Comportamento reprodutivo do araçari-castanho *Pteroglossus castanotis* (GOULD, 1834) (Piciformes, Ramphastidae) em cativeiro: nidificação e cuidado com filhotes**. Curitiba, 2006, 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), curso de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

DEUGNIER, UY.M.; MARGULES, S.; BRISSOT, P., et al. Comparative study between biochemical and histological methods and image analysis in liver iron overload. **Journal of Clinical Pathology**, v.35, p.45-51, 1982.

DEUGNIER, Y.M.; LOREAL, O.; TURLIN, B., et al. Liver pathology in genetic hemochromatosis : a review of 135 homozygous cases and their bioclinical correlations. **Gastroenterology**, v.102, p.2050-2059, 1992.

DIERENFELD, E.S.; PINIS, M.T.; SHEPPARD, C.D. Hemosiderosis and dietary iron in birds. **Journal of Nutrition**, v.124: 2685-2686, 1994.

DORRESTEIN, G.M.; GRINWIS, G.M.; DOMINGUEZ, L., et al. An induced iron storage disease syndrome in doves and pigeons: A model for hemochromatosis in mynah birds. **Proceedings of the Association of Avian Veterinarians**, New Orleans, p.108-112, 1992.

DORRESTEIN, G.M.; METE, A.; LEMMENS, I.; BEYNEN, A.C. Hemochromatosis/iron storage: New developments. In: Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians, **Proceedings**...Portland, Oregon: Association of Avian Veterinarians, 2000, p.233-238.

DREWS, A.V.; REDROBE, S.P.; PATTERSON-KANE, J.C. Successful reduction of hepatocelular hemosiderin content by dietary modification in toco toucans (*Ramphastos toco*) with iron-storage disease. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.18, n.2, p.101-105, 2004.

FAIRBANKS, V.F. Iron in Medicine and Nutrition. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (ed.). **Modern Nutrition in Health and Disease**. Maivem, Pennsylvania: Lea and Febiger, 1994, p.185-213.

FRANKENHUIS, M.T.; Van EYK, H.; ASSINK, J.A.; ZWART, P. Iron storage in livers of birds of paradise. **Proc 2nd Eur Symp Avian Med Surg**, Utrecht, Netherlands, p.92-96, 1989.

FRANKENHUIS, M.T; ASSINK, J.A. Iron accumulation in the livers of birds of paradise. **British Veterinary Zoological Society Newsletter**, v.12, p.2, 1981.

FUDGE, A.M. Avian liver and gastrointestinal testing. In: FUDGE, A.M. (ed.). **Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000a, p.47-55.

GERLACH, H.; ENDERS, F.; CASARES, M. Discussion of the increased iron content in the liver of some bird species (particularly parrots). In: **Midwest Avian Research Expo**. 1996, Toledo, OH: MARE, 1996, pp. 75-78.

GOSSELIN, S. J.; KRAMER, L. Pathophysiology of excessive iron storage in mynah birds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.183, p.1238-1240, 1983.

GOULART, C.E.S.; CUBAS, Z.S. Determinação de valores séricos de ferro, ferritina, capacidade total de ligação de ferro e índice de saturação de transferrina em *Ramphastos toco* (Tucano-toco). XXVI Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil e II Encontro de Zoológicos do Mercosul, 2002. Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade de Zoológicos do Brasil, 2002, p.17.

GUYADER, D.; GANDON, Y. Quantification de la surcharge en fer, **Bulletin de l'Académie Nationale de Medecine**. v.184, p.487-504, 2000.

JENNINGS, J. Captive management: family Ramphastidae (toucans). In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press, 2001, p.186-188.

JOHNSON-DELANEY, C.A.; HARRISON, L.R. Passerines and softbills. In: **Exotic Companion Medicine Handbook**. Lake Worth, FL: Wingers, 1996, p.23-26.

LOWENSTINE, L. J. Nutritional disorders of birds. In: FOWLER, M.E. (ed.). **Zoo and Wild Animal Medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986, p.201-212.

LOWESTINE, L.J.; MUNSON, L. Iron overload in the animal kingdom. In: FOWLER, M.E.; MILLER, R.E. (Ed.). **Zoo & Wild Animal Medicine: Current Therapy 4**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999, p.260-268.

LUMEIJ, J.T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J.J.; BRUSS, M.L.; HARVEY, J.W. (eds.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997, p.857-883.

MASUDA, T.; KASAI, T.; SATODATE, R. Quantitative measurement of hemosiderin deposition in tissue sections of the liver by image analysis, **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v.15, p.379-382, 1993.

McDONALD, D. **Iron storage disease and commercially formulated bird foods: a review of nutritional implications**. Prepared in April 2003, by Zoo Animal Nutrition, v.3. Disponível em <http://www.avianmedicine.net/avmed/research/McDonald-Isd-vit%20A-Zoo-Anim-Nut-version%202.doc>; Acessado em: 22 out. 2007.

MELO-JÚNIOR, M.R.; ARAÚJO-FILHO, J.L.S.; MACHADO, M.C.F.P.; PATU, V.J.R.M. Análise digital de imagens em patologia – a interface com a Engenharia Biomédica. In: **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.22, n.3, p.239-242, 2006.

METE, A; HENDRIKS, H.G; KLAREN, P.H.M; DORRESTEIN, G.M; VAN DIJK, J.E; MARX, J.J.M. Iron metabolism in mynah birds (*Gracula religiosa*) resembles human hereditary haemochromatosis. **Avian Pathology**, v.32, n.6, p.625-632, 2003.

METE, A; JALVING, R; VAN OOST, B.A; VAN DIJK, J.E; MARX, J.J.M. Intestinal over-expression of iron transporters induces iron overload in birds in captivity. **Blood cells, Molecules, and Diseases**, v.34, p.151-156, 2005.

MIKICH, S.B. Order Piciformes (Toucans, Woodpeckers). Biology. In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press. 2001, p.180-186.

MORRIS, P.J.; AVGERIS, S.E.; BAUMGARTNER, R.E. Hemochromatosis in a greater Indian hill mynah (*Gracula religiosa*): case report and review of the literature. **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, v.3, p.87-92, 1989.

NIELSEN, P.; ENGELHARDT, R.. DULLMANN, J. ; FISCHER, R. Non-invasive iron quantification by SQUID-biosusceptometry and serum ferritin iron as new diagnostic parameters in hereditary hemochromatosis, **Blood Cell, Molecules and Diseases**, v.29, p.451-458, 2002.

OLYNYK, J.; HALL, P.; SALLIE, R., et al. Computerized measurement of iron in liver biopsies: a comparison with biochemical iron measurement. **Hepatology** v.12, p.26-30, 1990.

ORTEGA, L.; LADERO, J.M.; CARRERAS, M.P.; ALVAREZ, T.; TAXONERA, C.; OLIVÁN, M.P.; SANZ-ESPONERA, J.; DÍAZ-RUBIO, M. A computer-assisted morphometric quantitative analysis of iron overload in liver biopsies. A comparison with histological and biochemical methods. **Pathology – Research and Practice**, 201, 673-677, 2005.

RODENBUSCH, C.R. Hemossiderose e hemocromatose em aves silvestres – revisão. **Clínica Veterinária**, v.9, n.53, p 44-50, nov./dez. 2004.

ROELS, S.; DUCATELLE, R.; CORNELISSEN, H. Quantitative image analysis as an alternative to chemical analysis for follow-up of liver biopsies from a toucan with hemochromatosis: a technique with potential value for the follow-up of hemochromatosis in humans. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v.18, n.3, p.221-224, 1996.

SCHMIDT, R.E.; REAVILL, D.R.; PHALEN, D.N. Liver, 4 chapter. In: _____ **Pathology of Pet and Aviary Birds**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Company, 2003, p.67-93.

SEIBELS, B.; LAMBERSKI, N.; GREGORY, C.R.; SLIFKA, K.; HAGERMAN, A.E. Effective use of tea to limit dietary iron available in starlings (*Sturnus vulgaris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.34, n.3, p.314-316, 2003.

SHEPPARD, C.; DIERENFELD, E. Iron storage disease in birds: speculation on etiology and implications for captive husbandry. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.16, n.3, p.192-197, 2002.

SIBLEY, C.G. **Birds of the World**. Thayer Birding Software, Ltd., 1996.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997, p.490-518.

SOUZA, A.F.M.; CARVALHO-FILHO, R.J.; CHEBLI, J.F. Hemocromatose hereditária. Relato de caso e revisão da literatura. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.38 n.3, jul./set., 194-202, 2001.

SPALDING, M.G.; KOLLIAS, G.V.; MAYS, M.B.C.; PAGE, D.; BROWN, M.G. Hepatic encephalopathy associated with hemochromatosis in a toco toucan. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.189, n.9, nov., 1986.

SPELMAN, L.H.; OSBORN, K.G.; ANDERSON, M.P. Pathogenesis of hemosiderosis in lemurs – role of dietary iron, tannin, and ascorbic acid. **Zoo Biology**, v.8, p.239-251, 1989.

STREFEZZI, R.F. **Indicadores prognósticos para mastocitomas: estudo morfométrico e imunoistoquímico**. São Paulo, 2007. 94p. Dissertação de Doutorado em Patologia Experimental e Comparada. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

TAYLOR, J.J. Iron accumulation in avian species in captivity. **Dodo**, v.21, p.126-131, 1984.

THRUSHFIELD, M.V. Descrevendo a ocorrência de doenças. In: _____. **Epidemiologia Veterinária**, segunda edição. São Paulo: Roca, 2004. p.47-73.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de documentos científicos**. Curitiba: Editora da UFPR, 2002. v.2: Teses, dissertações, monografias e trabalhos acadêmicos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de documentos científicos**. Curitiba: Editora da UFPR, 2002. v.8: Redação, editoração.

WADSWORTH, P.F.; JONES, D.M.; PUGSLEY, S.L. Hepatic haemosiderosis in birds at the Zoological Society of London. **Avian Pathology**, v.12, p.321-330, 1983.

WARD, R.J.; IANCU, T.C.; HENDERSON, G.M.; KIRKWOOD, J.R.; PETERS, T.J. Hepatic iron overload in birds: analytical and morphological studies. **Avian Pathology**, v.17, p.451-464, 1988.

WERNER, P.R. **Patologia Geral Veterinária**, Edição 2005. Curitiba, PR. Apostila, 2005.

WHITESIDE, D.P. **Evaluation of the oral iron chelator deferiprone in the white leghorn chicken and domestic pigeon**. Guelph, Canadá, 2001. 235p. Dissertação de Doutorado em Ciências Veterinárias, The University of Guelph, Ontário, Canadá. National Library of Canadá. Disponível em: <http://www.collectionscanada.ca/obj/s4/f2/dsk3/ftp05/NQ61990.pdf>; Acessado em: 14 out. 2007.

WORELL, A.B. Further investigations in rhamphastids concerning hemochromatosis. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS, Lake Worth, FL. **Anais...**Lake Worth, FL: AAV, 1993, p.98-107.

WORELL, A.B. Phlebotomy for treatment of hemochromatosis in two sulfur-breasted toucans. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS, 1991a, Chicago, IL. **Anais...**, Chicago, IL: AAV, 1991a, p.9-14.

WORELL, A.B. Serum iron levels in ramphastids. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS, 1991, Chicago, IL. **Anais...**Chicago, IL: AAV, 1991b, p.120-130.

WORELL, A.B. Toucans and Mynahs. In: ALTMAN, R.B.; CLUBB, S.L.; DORRESTEIN, G.M.; QUESENBERRY, K. **Avian Medicine and Surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, p.910-917.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação da fauna requer políticas efetivas de preservação dos ecossistemas naturais. Outras medidas específicas incluem ações de conservação *ex-situ* de espécies ameaçadas de extinção, de forma a manter populações geneticamente viáveis. Para que isso aconteça, as técnicas de manutenção e reprodução de animais silvestres em cativeiro devem ser aprimoradas e plenamente dominadas. Em cativeiro, os animais estão sujeitos a uma diversidade de doenças infecciosas e não infecciosas que podem causar impacto significativo na conservação das matrizes reprodutivas. As técnicas de criação de algumas espécies silvestres não são ainda plenamente conhecidas em razão de particularidades biológicas que determinam manejos diferenciados. É o caso das aves da família Ramphastidae - os tucanos e araçarís - que necessitam de manejo nutricional distinto em comparação a outros grupos de aves, pois são espécies particularmente suscetíveis à hemocromatose. Apesar de esta doença ser conhecida em aves silvestres desde a década de 1970 e poder ser prevenida por meio de nutrição adequada, a hemocromatose continua a ser relatada em zoológicos e criatórios no Brasil. Em cativeiro, o que se percebe é que a mortalidade de tucanos e araçarís é relativamente alta enquanto que a taxa de natalidade é muito baixa. Com isso, a maioria das aves dessa família atualmente existentes em zoológicos e criatórios brasileiros acaba sendo originária da natureza – são depositadas pelos órgãos ambientais encarregados da fiscalização e apreensão ao tráfico de animais silvestres. Havia, até o momento, a suspeita de que a hemocromatose era responsável pela mortalidade de uma parcela considerável de tucanos e araçarís em zoológicos e criatórios no Brasil, mas isso nunca havia sido comprovado por estudo científico. As suspeitas eram baseadas em relatos de casos, sem que estes tivessem sido analisados de forma conjunta, com amostras de várias instituições. Em razão da ausência de informações epidemiológicas sobre a doença, persistiu entre os criadores a falsa crença de que a hemocromatose era uma doença esporádica, contribuindo para esse preconceito o fato de ser uma doença que se manifesta de forma irregular e ao acaso e, além disso, muitas vezes não era diagnosticada em razão da ausência de exame histopatológico. O presente estudo

permitiu conhecer a prevalência da sobrecarga de ferro e hemocromatose na população estudada, bem como demonstrar que as doenças hepáticas, incluindo a hemocromatose, são importantes causas de morte nesse grupo de aves. O estudo comprovou que as técnicas de manutenção de aves da família Ramphastidae atualmente empregadas não estão corretas em várias instituições brasileiras, sendo necessário investir em pesquisas na área de nutrição animal, diagnóstico e clínica médico-cirúrgica. É urgente implantar nos zoológicos e criatórios programas profiláticos que possibilitem maior longevidade e diminuam as taxas de mortalidade dos ramfástídeos. Pelas informações inéditas geradas, o presente estudo dá uma contribuição importante para o conhecimento e conservação *ex-situ* das aves da família Ramphastidae no Brasil.

ANEXO 1 – Fotos de tucanos e araçarís

FIGURA 23 – FOTOGRAFIA DE TUCANO TOCO (*Ramphastos toco*)



FIGURA 24 – FOTOGRAFIA DE TUCANO-DE-BICO-VERDE (*Ramphastos dicolorus*)



FIGURA 25 – FOTOGRAFIA DE TUCANO-DE-BICO-PRETO (*Ramphastos vitellinus*)



FIGURA 26 – FOTOGRAFIA DE TUCANO-DE-PAPO-BRANCO (*Ramphastos tucanus*)



FIGURA 27 – FOTOGRAFIA DE ARAÇARI-BANANA (*Bailloni* *bailloni*). IMAGEM DO SITE WWW.FAZENDAVISCONDE.COM.BR



FIGURA 28 – FOTOGRAFIA DE UM MACHO DE ARAÇARI-POCA (*Selenidera maculirostris*). FOTO DE STEPHEN J. DAVIES



FIGURA 29 – FOTOGRAFIA DE ARAÇARI-CASTANHO (*Pteroglossus castanotis*). FOTO DE SHUN CHEUNG



ANEXO 2 – Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO


Certificamos que o protocolo no. 016/2006, referente ao projeto "Diagnóstico e prevalência da hemocromatose/hemossiderose hepática em tucanos e araçarís (família Ramphastidae, Ordem Piciformes) por meio de análises histológicas e bioquímicas séricas", sob a responsabilidade de Zalmir Silvino Cubas, na forma em que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 29 de junho de 2006. Este certificado expira em 31 de julho de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 016/2006, regarding the project "Diagnóstico e prevalência da hemocromatose/hemossiderose hepática em tucanos e araçarís (família Ramphastidae, Ordem Piciformes) por meio de análises histológicas e bioquímicas séricas", in charge of Zalmir Silvino Cubas, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Parana, Southern Brazil) during session on June 29, 2006. This certificate expires on July 31, 2008.

Curitiba, 29 de junho de 2006


Carla Forte Maiolino Moleato
Presidente


Rogério Ribas Lange
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná

ANEXO 3 - Documento de aprovação do IBAMA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13988-1	Data da Emissão: 21/01/2008 15:59	Data de Validade: 20/01/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 1466614	Nome: ZALMIR GILVINO CUBAS	CPF: 519.560.249-87
Título do Projeto: ESTUDO RETROSPECTIVO DA HEMOSSIDEROSE E HEMOCROMATOSE EM FÍGADO DE AVES DA SUBFAMÍLIA RAMPASTINAE (TUCANOS E ARAÇARIS)		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ		CNPJ: 75.055.679/0001-49

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	Esta autorização não isenta o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/sisbio . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ.
6	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Fabiano Morbin Ferreira	Orientador	011.030.709-59	19143074-5 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SÃO PAULO	SP	São Paulo	Faz de UC
2	POZ DO IGUAÇU	PR	Foz do Iguaçu	Faz de UC

1	Atividades	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ
---	------------	--

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ramphastos vitellinus, Ramphastos tucanus, Pteroglossus castaneus, Selenidera maculirostris, Ramphastos dicolorus, Ramphastos toco

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Fragmento de tecidológico
---	----------------------------	---------------------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	coleta

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na Internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 38543988



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13998-1	Data da Emissão: 21/01/2008 15:59	Data de Validade: 20/01/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 1496614	Nome: ZALMIR SILVINO CUBAS	CPF: 519.550.249-87
Título do Projeto: ESTUDO RETROSPECTIVO DA HEMOSSIDEROSE E HEMOCROMATOSE EM FÍGADO DE AVES DA SUBFAMÍLIA RAMPHASTINAE (TUCANOS E ARAÇARIS)		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ		CNPJ: 75.095.679/0001-49

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta ser comunicada ao Ibama por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica, preferencialmente depositado em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Taxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na Internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 38543988



Página 2/2